

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL - UFMS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

PETERSON VIEIRA DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROTOXICIDADE
MEDICAMENTOSA**

Campo Grande, MS.
2019

PETERSON VIEIRA DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROTOXICIDADE
MEDICAMENTOSA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

Campo Grande, MS.
2019

PETERSON DE ASSIS VIEIRA

**AVALIAÇÃO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROTOXICIDADE
MEDICAMENTOSA**

Tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Dr. Marco Antônio Gonçalves
Hospital Regional de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Larissa Correa Hermeto
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Dr. João Alexandre Queiroz Juveniz
Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian - HUMAP/EBSERH

Prof. Dr. Roberto Antonioli da Silva
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Campo Grande, MS.
2019

DEDICATÓRIA

À DEUS,

Pelo Seu infinito amor, graça e misericórdia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Francisco e Regina,

Pelo apoio fraternal.

À minha leal e amada companheira, Patrícia

Pelo amor, incentivo, paciência e por sempre estar ao meu lado.

Aos meus filhos, Peterson, Vinícius e Maria Fernanda

Por serem meu estímulo e inspiração.

RESUMO

Vieira, P. S. **AValiação DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROTOXICIDADE MEDICAMENTOSA.** [Tese de doutorado]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2019.

A lesão renal aguda (LRA) é uma doença caracterizada pela queda da taxa de filtração glomerular e é considerada um problema de saúde pública, pois causa morbidade e mortalidade. Em alguns casos, a terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTM) pode ser uma opção para a retomada da função e homeostase do rim. Assim, a presente pesquisa avaliou os efeitos da terapia celular com CTM derivadas da medula óssea na lesão renal aguda em ratos Wistar machos expostos ao agente quimioterápico cisplatina. Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais (n = 06): Grupo doador de medula óssea (GD); Grupo Controle (GC) – animais tratados com solução tampão fosfato salino (PBS) e que não receberam o transplante de CTM; Grupo Nefrotoxicidade (GN) – animais tratados com o quimioterápico cisplatina (4mg/kg) e que não receberam o transplante de CTM; e o Grupo Nefrotoxicidade + Célula Tronco Mesenquimais (GN + CTM) – animais tratados com a cisplatina e que receberam o transplante de CTM ($1,0 \times 10^6$ células). Os resultados demonstraram que a terapia celular causou redução dos níveis plasmáticos de ureia e creatinina. Na análise histopatológica observou-se redução ($p < 0,05$) da frequência de danos no GN + CTM em relação ao GN. Diante dos resultados apresentados, infere-se que a terapia celular com células tronco mesenquimais seja uma possibilidade de escolha para o tratamento da lesão renal aguda.

Palavras-chave: cisplatina, rim, imunomodulação, transplante

ABSTRACT

Vieira, P. S. EVALUATION OF TRANSPLANTATION OF MESENQUIMIAL STEM CELLS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF MEDICINAL NEFROTOXICITY. [Doctoral thesis]. Campo Grande: Federal University of Mato Grosso do Sul; 2019.

Acute kidney injury (AKI) is a disease characterized by a drop in glomerular filtration rate and is considered a public health problem because it causes morbidity and mortality. In some cases, cell therapy with mesenchymal stem cells (MSC) may be an option for resumption of kidney function and resting. Thus, the present study evaluated the effects of cell therapy with bone marrow-derived MSC on acute renal injury in male Wistar rats exposed to the chemotherapeutic agent cisplatin. The animals were divided into 4 experimental groups (n = 06): Bone marrow donor group (DG); Control Group (CG) - animals treated with phosphate buffered saline solution (PBS) and not receiving MSC transplantation; Nephrotoxicity Group (NG) - animals treated with the chemotherapeutic cisplatin (4mg/kg) and that did not receive MSC transplantation; and the Nephrotoxicity Group + Mesenchymal Stem Cell (NG + MSC) – animals treated with cisplatin and who received MSC transplantation ($1,0 \times 10^6$ cells). The results demonstrated that the cellular therapy caused reduction of plasma levels of urea and creatinine. Histopathological analysis showed a reduction ($p < 0.05$) in the frequency of NG + MSC damage in relation to NG. In view of the results presented, it is inferred that cell therapy with mesenchymal stem cells is a possibility of choice for the treatment of acute renal injury.

Key words: cisplatin, kidney, Immunomodulation, transplantation

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

LRA	Lesão Renal Aguda
DRC	Doença Renal Crônica
CTM	Célula Tronco Mesenquimal
INBIO	Instituto de Biociências
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
PBS	Tampão fosfato-salino
DMEN	Dulbecco modified Eagle's Low Glucose

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - A ADMINISTRAÇÃO DE 4 E 5 MG/KG DE CISPLATINA	21
FIGURA 2 – ASPECTOS DAS CULTURAS EM EXPANSÃO.....	22
FIGURA 3 - FOTOMICROGRAFIA DAS CTM.	23
FIGURA 4 – CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE UREIA E CREATININA NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	24
FIGURA 5 - MEDIANA E DESVIO PADRÃO DO ESCORE DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS CORTES TRANSVERSAIS DE RINS SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO BANFF 97	25
FIGURA 6 - CORTES HISTOLÓGICOS DO TECIDO RENAL.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2.2.1. MODELO DE DOENÇA	14
2.2.2. OBTENÇÃO, CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.....	14
2.2.3. TERAPIA CELULAR E NEFROTOXICIDADE.....	14
3. ESTUDO I: NEFROTOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA E CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA.....	15
3.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1.1. AGENTES QUÍMICOS	15
3.1.2. ANIMAIS	15
3.1.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	15
3.1.3.1. EXPERIMENTO PILOTO.....	16
3.1.3.1.1. AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS DA FUNÇÃO RENAL.....	16
3.1.3.2. ESTUDO EXPERIMENTAL	16
3.1.3.2.1. OBTENÇÃO, CULTIVO E EXPANSÃO DA CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA.....	16
3.1.3.2.2. DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA, ADIPOGÊNICA E CONDRÓGENICA.....	17
3.1.3.2.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	19
3.1.3.2.4. TRANSPLANTE DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.....	19
3.1.3.2.5. AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS DA FUNÇÃO RENAL.....	19
3.1.3.2.6. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	20
3.1.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
3.2. RESULTADOS.....	21
3.2.1. GRUPO 1 (GRUPO CISPLATINA).....	21
3.2.2. ESTUDO EXPERIMENTAL.....	21
3.2.2.1. EXPANSÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS	21
3.2.2.2. AS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DIFERENCIAM-SE EM CÉLULAS OSTEOGÊNICAS, ADIPOGÊNICAS E CONDRÓGENICAS <i>IN VITRO</i>.....	22
3.2.2.3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE A NEFROTOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA.	23
3.2.2.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	24
4. DISCUSSÃO	27
5. REFERÊNCIAS	29
ARTIGO.....	33

1. INTRODUÇÃO

O perfil demográfico do Brasil transforma-se desde a década de 70 e as famílias, majoritariamente, rurais e numerosas, acometidas pelo alto risco de mortalidade infantil, deu lugar às famílias urbanas e com menor número de filhos. Essa transição determinou aumento do número de adultos e idosos na população brasileira e um declínio no número de crianças e jovens (LEONE; MAIA; BALTAR, 2010; MIRANDA; MENDES; SILVA, 2016; VASCONCELOS; GOMES, 2012).

A transição demográfica, com consequente mudança da estrutura etária da população é fruto, primeiramente, da redução das taxas de mortalidade e, posteriormente, da queda nas taxas de natalidade (ALVES, 2008). Auxiliaram no primeiro processo o aumento do saneamento básico, o controle e a erradicação de grandes epidemias, os avanços terapêuticos como a melhoria da antibioticoterapia e quimioterapia, dentre outros (OLIVEIRA; ALVES, 2009; SANTOS; MARINHO, 2013); além do processo de urbanização e industrialização anteriormente citado (LEONE; MAIA; BALTAR, 2010; MIRANDA; MENDES; SILVA, 2016; OLIVEIRA; ALVES, 2009; SANTOS; MARINHO, 2013; VASCONCELOS; GOMES, 2012).

Tendo passado por essas alterações, estimava-se que o Brasil no ano de 2050 terá entre 253 e 259,8 milhões de habitantes (IBGE, 2004; 2008). No ano de 2000 a população brasileira tinha 30% de indivíduos com idade entre zero e 14 anos e apenas 5% de indivíduos com mais de 65 anos e dentre esses cerca de 1,8 milhão tinha mais de 80 anos. Porém, estima-se um perfil distinto desse para o ano de 2050 quando a população deverá ter 18% de indivíduos com idade entre zero e 14 anos e essa mesma quantidade de indivíduos com mais de 65 anos. Nesse período é esperado que tenham 13,7 milhões de indivíduos com mais de 80 anos (IBGE, 2004).

Em geral, 60% de todos os tipos de câncer acometem indivíduos com mais de 65 anos de idade e a mortalidade associada a essa doença, nessa população, chega a 70%. Logo, a população idosa representa e representará ainda mais, nas décadas futuras, um grande problema de saúde pública no que se refere aos tratamentos oncológicos (PONTES *et al.*, 2014; RIES; KOSARY; HANKEY, 1998).

Para se atingir as maiores taxas de sucesso no tratamento oncológico, e principalmente para reduzir as taxas de comorbidades, é preciso que se faça a seleção adequada da terapêutica observando, em especial, características peculiares dos idosos

tais como a função renal reduzida e a predisposição à maior toxicidade quando administrados os medicamentos (PONTES *et al.*, 2014; WILDIERS *et al.*, 2003).

Não obstante, mesmo diante de escolhas terapêuticas adequadas, não somente a população idosa, mas também pacientes oncológicos em geral, em consequência dos tratamentos com medicamentos contra o câncer, que são tóxicos, e, muitas vezes devido à hospitalização por longos períodos e polimedicações, ocorre o desenvolvimento de outras doenças como é o caso da insuficiência renal que se desenvolve como complicações de outras doenças e dos tratamentos das mesmas (SANTOS; MARINHO, 2013). As internações hospitalares registram pelo menos cerca de 2 a 5% de pacientes que evoluem com insuficiência renal (HOSTE; SCHURGERS, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; URT-FILHO *et al.*, 2016; WEN *et al.*, 2010). Mas, quando avaliadas as unidades de terapia intensiva esse número aumenta para cerca de 20 a 40,3% (HOLCOMBE; FEELEY, 2008; SANTOS; MATOS, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2010). Além disso, destaca-se que em unidades de terapia intensiva há uma mortalidade média de 70% dos pacientes que evoluíram com insuficiência renal (SANTOS; MARINHO, 2013).

Nesse quantitativo anteriormente descrito estão incluídos pacientes tratados com quimioterapia e radioterapia que também são causadores de insuficiência renal (HUMPHREYS; SOIFFER; MAGEE, 2005). Dentre os quimioterápicos, a cisplatina, usada na maioria dos tratamentos de tumores sólidos e hematológicos (SERPELONI *et al.*, 2013), é nefrotóxica, mesmo estando em concentrações plasmáticas não tóxicas, devido à sua capacidade de alterar o sistema de transporte renal (GORDON; GATTONE, 1986; REN *et al.*, 2002; SERPELONI *et al.*, 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde estima-se que haja atualmente em torno de 850 milhões de pessoas com doença renal, decorrente de várias causas no mundo. A doença renal crônica (DRC) causa pelo menos 2,4 milhões de óbitos por ano, com taxa crescente de mortalidade e já é a sexta causa de morte que mais cresce. Já a lesão renal aguda, importante risco para a DRC, afeta mais de 13 milhões de pessoas no mundo, sendo que 85% desses casos estão concentrados em países de baixa e média renda. Estima-se que cerca de 1,7 milhões morram anualmente devido à insuficiência renal aguda no mundo (SBN, 2019).

Em geral, a insuficiência renal aguda não possui tratamento específico e o que se propõe é eliminar ou tratar a sua causa ou sintomas (FRY; FARRINGTON, 2006; URT-FILHO *et al.*, 2016). No entanto, como essa doença está sujeita a complicações e

cronicidade, o desenvolvimento de terapias inovadoras/alternativas para o reestabelecimento da função renal, com rapidez, segurança e efetividade, são cada vez mais requeridos (URT-FILHO *et al.*, 2016), principalmente nesse momento em que a população brasileira está envelhecendo (GOMES, 2012; LEONE; MAIA; BALTAR, 2010; VASCONCELOS; MIRANDA; MENDES; SILVA, 2016).

As propriedades imunoprotetoras das células troncos mesenquimais (CTM), juntamente com seu potencial regenerativo tecidual, as tornam candidatas interessantes para aplicação clínica (VALENCIA *et al.*, 2016)

Diante do exposto o presente trabalho se propôs a padronizar no Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen) um modelo de insuficiência renal aguda medicamentosa, usando o quimioterápico nefrotóxico cisplatina, bem como a extração, o cultivo e a diferenciação de células tronco mesenquimais da medula óssea e, por fim, avaliar os efeitos do transplante dessas células tronco mesenquimais em modelo pré-clínico (experimental) de nefrotoxicidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da terapia celular com células tronco mesenquimais em modelo de nefrotoxicidade causada por medicamento quimioterápico.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Modelo de Doença

Padronizar o modelo de nefrotoxicidade induzida por cisplatina.

2.2.2. Obtenção, cultivo e diferenciação de células tronco mesenquimais

Padronizar a obtenção, o cultivo e a diferenciação de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratos *Wistar*.

2.2.3. Terapia celular e Nefrotoxicidade

Avaliar os efeitos das células tronco mesenquimais na nefrotoxicidade induzida por cisplatina em modelo experimental por meio de estudos bioquímicos e histológicos.

3. Nefrotoxicidade induzida por cisplatina e células tronco mesenquimais da medula óssea

3.1. Material e Métodos

3.1.1. Agentes Químicos

Para a indução da nefrotoxicidade foram utilizados dois protocolos com o quimioterápico cisplatina (Fauldcispla LIBBS®, Lote: 12GO702). O primeiro foi baseado em Urt-Filho *et al.* (2016) e Wong *et al.* (1993), com modificações, quando a dose de 5mg/kg de peso corpóreo (p.c.) foi administrada, por via intraperitoneal (i.p.), uma vez por semana ao longo de 4 semanas consecutivas. O segundo protocolo foi baseado em Canta *et al.* (2011) quando a dose de 4mg/kg (p.c., i.p.) foi administrada uma vez por semana ao longo de 4 semanas consecutivas.

3.1.2. Animais

Foram utilizados 36 ratos *Wistar*, machos e sexualmente maduros, provenientes do Biotério Central do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (INBIO/UFMS). Os animais foram mantidos, em trios, em caixas de propileno recobertas por cepilho e alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada *ad libitum*. As caixas foram mantidas em estante ventilada (Alesco®) sob condições padronizadas de climatização com fotoperíodo de doze horas (12 horas de claro: 12 horas de escuro), temperatura em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $55\pm 10\%$. O experimento foi conduzido em concordância com as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS (Protocolo #532/2013).

3.1.3. Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos em três grupos sendo o (I) Grupo I composto por 12 animais destinados ao experimento piloto; o (II) Grupo II composto por 6 animais utilizados como doadores de células tronco mesenquimais da medula óssea; e o (III) Grupo III composto por 18 animais que compuseram os grupos do estudo experimental.

3.1.3.1. Experimento Piloto

Os animais do Grupo I (Grupo cisplatina) foram utilizados para o experimento piloto de padronização do modelo de doença, insuficiência renal aguda/nefrotoxicidade, 12 animais distribuídos em dois grupos experimentais. Os animais do primeiro grupo (Cisplatina 4 – CIS4) foram tratados com cisplatina uma vez por semana durante quatro semanas consecutivas com a dose de 4mg/Kg (p.c., i.p.) segundo o protocolo de Canta *et al.* (2011). Os animais do segundo grupo experimental (Cisplatina 5 – CIS5) foram tratados com cisplatina uma vez por semana durante quatro semanas consecutivas com a dose de 5mg/Kg (p.c., i.p.). Esse grupo baseou-se numa adaptação de Urt-Filho *et al.* (2016) e Wong *et al.* (1993).

3.1.3.1.1. Avaliações Bioquímicas da Função Renal

As avaliações bioquímicas da função renal, ureia e creatinina, foram realizadas antes da administração do quimioterápico (CIS4-0h; CIS5-0h) e 48 horas (CIS4-48h; CIS5-48h) e 30 dias (CIS4-30d; CIS5-30d) após a administração da última dose de cisplatina. A coleta de sangue foi realizada por meio do plexo retro-orbital após anestesia (Ketamina – 50mg/kg p.c., i.p.; Xilazina – 10mg/kg p.c., i.p.). Após a coleta, aguardou-se a sedimentação do sangue à 4°C e o soro foi congelado à -20°C até o momento da análise. A análise da creatinina foi realizada pelo método colorimétrico cinético (método Jaffé) e a análise da ureia pelo método cinético com urease e glutamato desidrogenase no equipamento automatizado COBAS 6000 (Roche Diagnostics®) segundo recomendações do fabricante.

3.1.3.2. Estudo Experimental

3.1.3.2.1. Obtenção, Cultivo e Expansão da Células Tronco Mesenquimais da Medula Óssea

Os animais do Grupo II, denominados Grupo Doadores - GD, foram submetidos à eutanásia por dose excessiva de anestésico (Tiopental®) via intraperitoneal. Em seguida, os fêmures foram coletados e cada um teve o seu lúmen intraósseo lavado com

5mL de solução tampão fosfato salino (PBS) suplementado com antibiótico a 1% (Penicilina/Estreptomicina, LGB Biotecnologia®) em condições estéreis. A suspensão celular foi centrifugada a 2.000 rpm por 5 minutos e o *pellet* foi ressuspensionado em 5 ml de PBS estéril. Esse procedimento foi realizado em triplicada. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado em 4 ml de DMEM-Low glucose (LGC Biotecnologia®) e essa suspensão celular foi transferida para um tubo cônico, contendo 4 ml de *SeptCell* (LGC Biotecnologia®), o qual foi centrifugado a 1.200 rpm por 30 minutos. Posteriormente, a fração mononuclear foi coletada com o auxílio de uma micropipeta e ressuspensionada em 5 ml de PBS. A suspensão celular foi centrifugada a 2.000 rpm por 5 minutos e, novamente, ressuspensionada em PBS. O procedimento foi repetido 5 vezes para a retirada de traços de *SeptCell*. Logo após, o *pellet* correspondente a cada animal doador foi semeado em dois frascos de cultura de 25 cm² contendo 10 ml de DMEM-Low glucose suplementado a 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia®) e 1% de antibiótico. Antes da transferência para o frasco de cultura uma alíquota de 10µl de cada animal foi separada para análise da viabilidade celular por azul de tripan (LGC Biotecnologia®). Para tanto misturou-se a amostra biológica com azul de tripan na proporção de 1:1 (BITTENCOURT *et al.* 2006; MEIRELLES; NARDI, 2003; URT-FILHO *et al.*, 2016).

O cultivo celular se deu em incubadora *Thermo Scientific*® a 37°C e 5% de CO₂. Durante a expansão celular o meio de cultura suplementado com 10% de soro bovino fetal foi trocado a cada 48 horas. Para as passagens (culturas com 70-80% de confluência), a tripsinização foi realizada com 1 ml de tripsina 0,25% (LGC Biotecnologia®) nos frascos de 25 cm² e 2mL nos frascos de 75 cm², após 3 lavagens com 5 ml de PBS. A inativação da tripsina foi realizada com meio de cultura suplementado na proporção 1:5 (MONTEIRO *et al.*, 2009). Após a inativação, a suspensão celular foi centrifugada a 2.000 rpm por 5 minutos e o *pellet* ressuspensionado em 1 ml de meio de cultura suplementado. Na primeira passagem, cada frasco de 25 cm² foi dividido em outros dois com a mesma capacidade. Na segunda e terceira passagens as células foram semeadas em frascos de 75 cm² na proporção de 1:1 e 1:2, respectivamente. Em todos os repiques retirou-se uma amostra de 10µl para a análise da viabilidade celular por azul de tripan.(1:1) (MONTEIRO *et al.*,2009; URT FILHO *et al.*,2016)

3.1.3.2.2. Diferenciação Osteogênica, Adipogênica e Condrogênica

Os frascos destinados aos experimentos de diferenciação, quando atingiram a confluência de 80%, foram novamente tripsinizados como descritos anteriormente e as células foram semeadas em 6 frascos de 25 cm², na concentração de 2×10^5 células. Três frascos de 25cm², utilizados como controles, foram mantidos em meio de cultura suplementado. Para a diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, as células foram mantidas por 24 horas em meio de cultura suplementado. Em seguida, esse foi substituído por meio de cultura *STEMPRO Adipogenic, Osteogenesis e Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen®) e mantidas em cultura por 14 dias para a diferenciação adipogênica e por 21 dias para as culturas osteogênicas e condrogênicas, com trocas duas vezes por semana.

Para a confirmação da diferenciação adipogênica, após descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 60 minutos, em temperatura ambiente, com formol a 10%. Em seguida, as células foram lavadas com isopropanol a 60% e, posteriormente, incubadas com *Oil Red O* (Sigma®) por 20 minutos em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada. A diferenciação foi confirmada pelo acúmulo de lipídeos intracelulares no 14º dia (PESARINI *et al.*, 2017; PESARINI *et al.*, 2018; SCHWEICH *et al.*, 2017).

Para a diferenciação osteogênica, após descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 10 min., em temperatura ambiente, com formol a 10%. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e coradas com *Alizarin Red* (Sigma®) por 5 min. em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada. A diferenciação osteogênica foi comprovada pela visualização de depósitos de cálcio no 21º dia (PESARINI *et al.*, 2017; PESARINI *et al.*, 2018; SCHWEICH *et al.*, 2017).

Durante o processo de cultivo celular da diferenciação condrogênica as células se agruparam formando um esferoide. Ao final do processo esse foi coletado por aspiração com uma pipeta Pasteur. O esferoide foi fixado em formalina tamponada 10% à temperatura ambiente e, posteriormente, foi submetido à rotina histológica no processador de tecidos automatizada TP09 TS Lupetec® conforme instruções do fabricante. Posteriormente, o esferoide foi cortado em micrótomo Leica® RM2235 em cortes com espessura 3 µm. As lâminas foram coradas com *Azul de Alcian* usando o kit EasyPath conforme as especificações do fabricante. A diferenciação foi confirmada pela presença de matriz extracelular rica de glicosaminoglicanos no 21º dia (PESARINI *et al.*, 2017; PESARINI *et al.*, 2018; SCHWEICH *et al.*, 2017).

3.1.3.2.3. Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos em três grupos sendo o (I) Grupo Controle - GC (n = 6) - os animais foram tratados com solução tampão fosfato (PBS) na proporção de 1ml/100g (p.c.; i.p.), uma vez por semana durante 4 semanas consecutivas, e uma nova administração de PBS foi realizada por via intravenosa (i.v.), pela veia caudal, 24 horas da última administração i.p.; (II) Grupo Nefrotoxicidade - GN (n = 6) - os animais foram tratados com cisplatina na concentração de 4 mg/Kg (p.c., i.p.), uma vez por semana durante 4 semanas consecutivas, e fez-se uma administração de PBS (i.v.), pela veia caudal, 24 horas da última administração i.p.; e o (III) Grupo Nefrotoxicidade + Célula Tronco Mensenquimais - GN+CTM (n = 6) - os animais foram tratados com cisplatina na concentração de 4 mg/Kg (p.c., i.p.), uma vez por semana durante 4 semanas consecutivas, e fez-se uma administração de CTM (i.v.), pela veia caudal, 24 horas após da última administração i.p. de cisplatina.. Para cada animal foi transplantado 1×10^6 células (URT-FILHO *et al.*, 2016).

A eutanásia dos animais aconteceu 30 dias após a administração das CTM.

3.1.3.2.4. Transplante das Células Tronco Mesenquimais

Após a confluência da terceira passagem, os frascos de cultura foram novamente tripsinizados como descrito. A suspensão celular foi centrifugada a 2.000 rpm por 5 minutos e o *pellet* ressuspensionado em PBS para obtenção das células utilizada na terapia celular na concentração de $1,0 \times 10^6$ células. Os animais do grupo GN+CTM receberam o transplante das CTM (i.v.) 24 horas após a administração da última dose de cisplatina. Os demais grupos, no mesmo período, receberam pela mesma via 1ml de PBS estéril (veículo da suspensão de CTM). Para a realização do transplante os animais foram anestesiados como descrito anteriormente.

3.1.3.2.5. Avaliações Bioquímicas da Função Renal

As avaliações bioquímicas da função renal, ureia e creatinina, foram realizadas como descrito para o experimento piloto porém 30 dias após a administração da última dose de cisplatina.

3.1.3.2.6. Análise Histopatológica

Após o período experimental os animais foram submetidos à eutanásia por dose excessiva de anestésico como descrito. Em seguida, os rins foram coletados, seccionados, fixados em formalina tamponada 10% e preparados segundo práticas de rotina histopatológica segundo Urt-Filho *et al.* (2016).

Para análise histopatológica utilizou-se o modelo duplo-cego e os critérios da Classificação de Banff 97, de acordo com Racusen *et al.* (1999) e com modificações de Urt-Filho *et al.* (2016) onde relata-se: 1) Tubulite: infiltrado linfocitário intratubular (necrose e substituição por fibrose não avaliados); 2) Degeneração hidrópica tubular: balanização citoplasmática das células do túbulo contorcido proximal (1+<25%; 2+25–75%; 3+>75%); 3) Proteína intratubular: presença de material eosinofílico dentro dos túbulos (contorcido proximal, distal, alça de Henle) – falência da filtração glomerular, falência de reabsorção tubular (1+<25%; 2+25–75%; 3+>75%); 4) Glomerulite: infiltrado linfocitário no glomérulo; 5) Arterite: infiltrado linfocitário nas arteríolas; 6) Infiltrado intersticial: linfócitos no interstício (1+0–25%; 2+25–75%; 3+>75%); 7) Fibrose intersticial: deposição de colágeno cicatricial; 8) Esclerose glomerular: fibrose de glomérulos (falência do néfron); 9) Calcificações; 10) Retração/Atrofia cortical: substituição parcial do parênquima renal por fibrose e/ou infiltrado inflamatório; 11) Apoptose/Necrose tubular: degeneração total ou parcial dos túbulos (1+<25%; 2+25–75%; 3+>75%); 12) Necrose global: glomérulos e túbulos envolvidos.

3.1.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada no *Software* GraphPad InStat 5 de acordo com a distribuição dos dados e para tanto aplicou-se o teste de ANOVA/Tukey para dados paramétricos e Kruskal-Wallis/Dunn para os dados não paramétricos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Grupo 1 (Grupo cisplatina)

A administração da cisplatina foi capaz de aumentar a concentração plasmática de ureia e creatinina acima dos níveis normais ($p < 0,05$) tanto 48h quando 30 dias após a última administração do quimioterápico (Figura 1). Relata-se também que no grupo CIS5 ocorreu a morte de um animal.

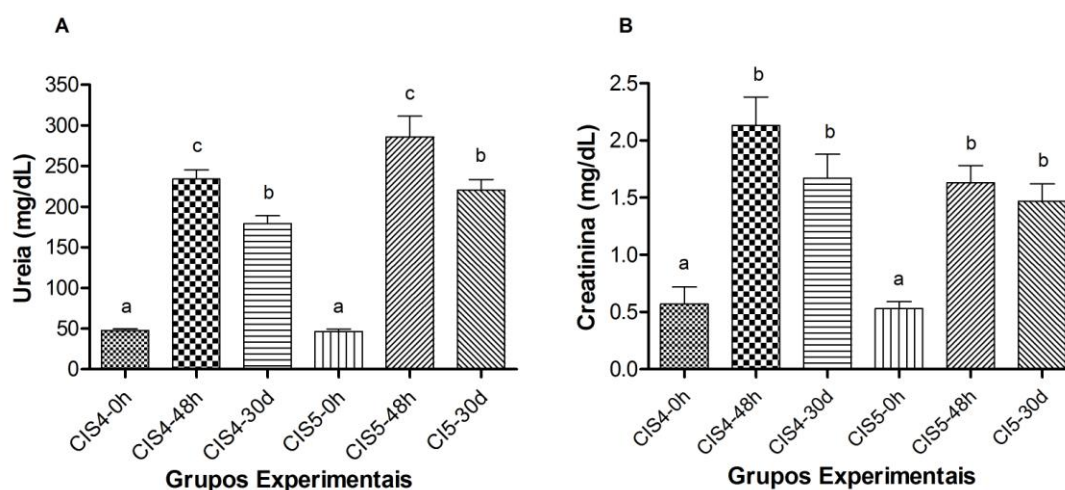


Figura 1 - A administração de 4 e 5 mg/kg de cisplatina, uma vez por semana por quatro semanas consecutivas, foi capaz de aumentar as concentrações plasmáticas de ureia (A) e creatinina (B) de forma significativa tanto 48h quanto 30 dias após a última administração do quimioterápico. Análise Estatística: ANOVA/Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas.

A partir dos resultados deste experimento escolheu-se a dose de 4 mg/kg para dar continuidade aos estudos, visto que essa dose foi suficiente para induzir a nefrotoxicidade, sem induzir óbito.

4.2. Estudo Experimental

4.2.1. Expansão das Células Tronco Mesenquimais

Após o isolamento das CTM essas foram expandidas em frascos de cultura com sucessivos repiques. A viabilidade foi observada em todas as passagens e manteve-se somente culturas com viabilidade superior a 95%. Na figura 2 podem ser observados os aspectos da cultura utilizadas no experimento.

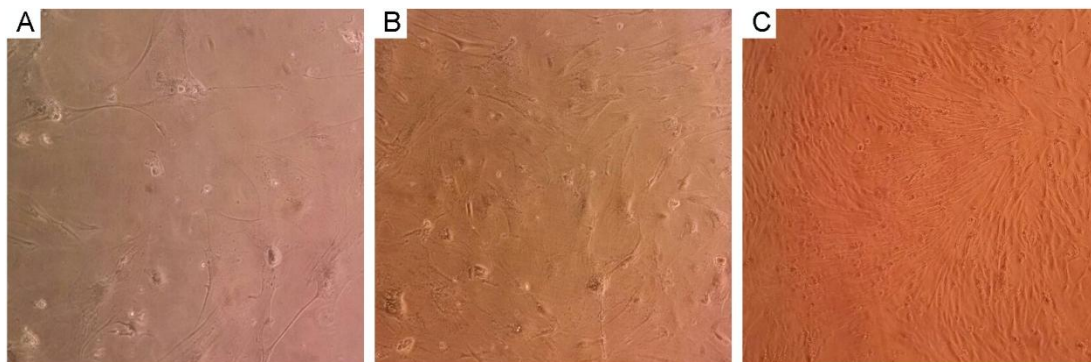


Figura 2 – Aspectos das culturas em expansão: A – Cultivo em fase inicial (20 dias), aumento 400x; B – Cultura com confluência próximo a 50% (7 dias após a primeira passagem – 1 repique), aumento de 400x; C – Cultura em confluência superior a 80%, aumento de 100x.

4.2.2. As Células Tronco Mesenquimais Diferenciam-se em Células Osteogênicas, Adipogênicas e Condrogênicas *in vitro*

A confirmação que as células em cultivo realmente se tratavam de CTM se deu por meio das diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica onde foi possível identificar o acúmulo de lipídeos corados com *Oil red O*, os depósitos de cálcio corados com *Alizarin Red* e a matriz extracelular rica de glicosaminoglicanos corados com Azul de Alcian, respectivamente (Figura 3).

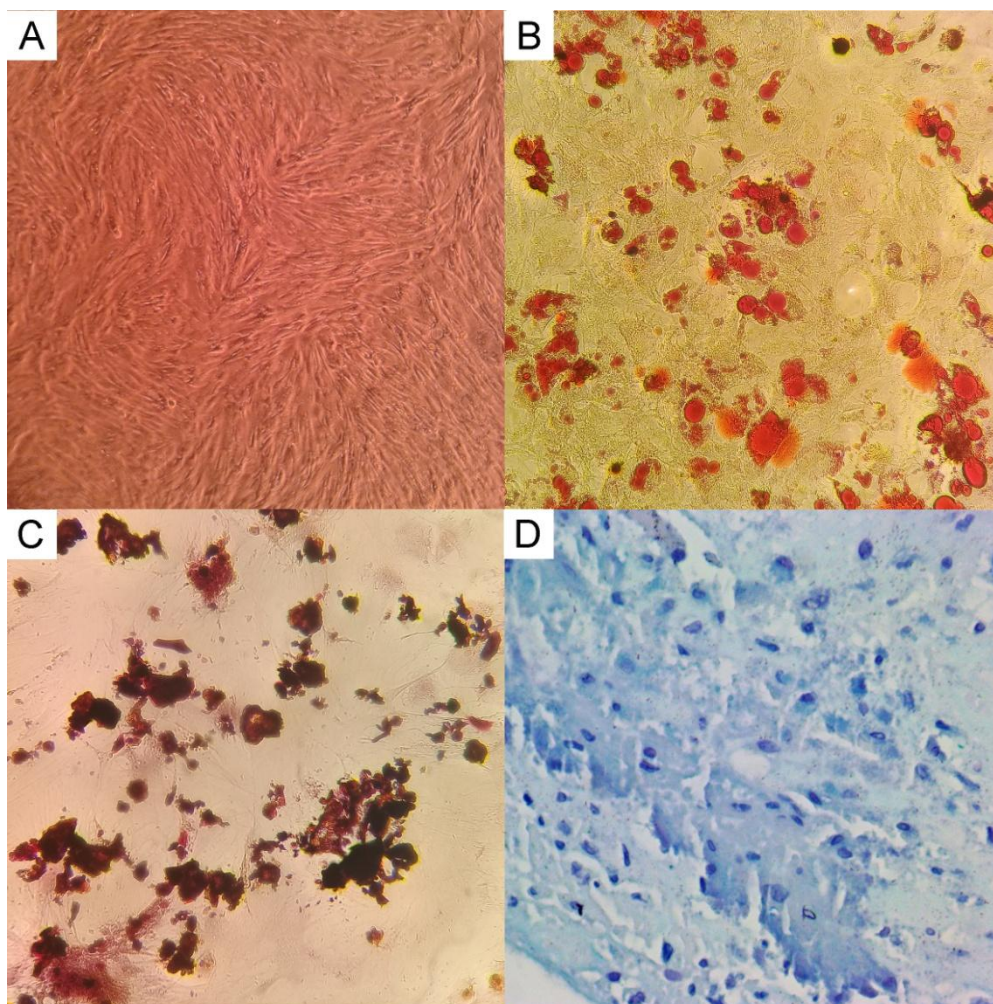


Figura 3 - Fotomicrografia das CTM: (A) cultura indiferenciada, (B) cultura em diferenciação adipogênica com vacúolos lipídicos corados por *Oil red O*, (C) cultura em diferenciação osteogênica com depósitos de cálcio corados por *Alizarin Red*, (D) Cultura em diferenciação condrogênica com matriz

4.2.3. Avaliação dos Efeitos do Transplante de Células Tronco Mesenquimais sobre a Nefrotoxicidade Induzida por Cisplatina.

A administração de cisplatina causou aumento ($p < 0,05$) da concentração plasmática de ureia no grupo nefrotoxicidade em relação ao controle negativo (Figura 4A). Da mesma forma, observou-se aumentou ($p < 0,05$) significativo da creatinina (Figura 4B).

Esses mesmos parâmetros foram avaliados em animais que receberam o tratamento com a cisplatina e, posteriormente, receberam o transplante de CTM. Os resultados indicaram que não houve diferenças significativas entre esse grupo (GN + CTM) e o grupo controle negativo (Figura 4). Mas, diferenças significativas foram

evidenciadas, com redução ($p<0,05$) dos níveis de ureia e creatinina, quando comparados os grupos GN e o GN+CTM (Figura 4).

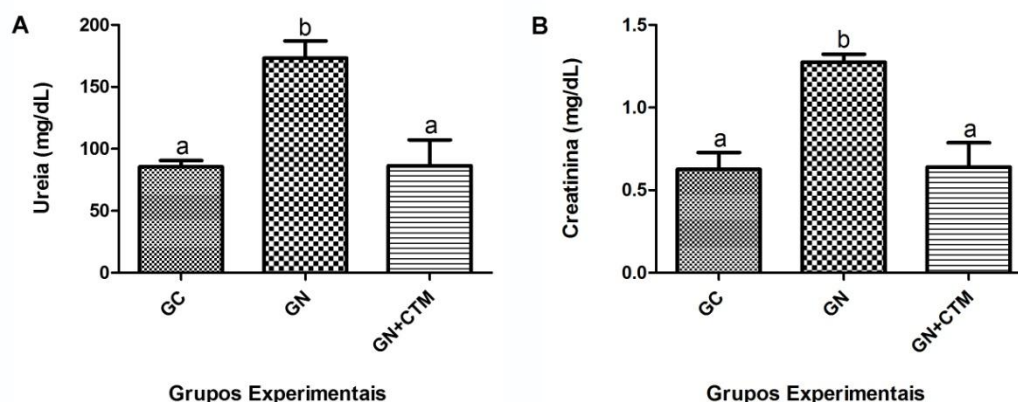


Figura 4 – Concentrações plasmáticas de ureia e creatinina nos diferentes grupos experimentais. A administração de 4 mg/kg de cisplatina, uma vez por semana por quatro semanas consecutivas, foi capaz de aumentar a concentrações plasmáticas desses dois marcadores bioquímicos da função renal. Os níveis foram normalizados naqueles animais que receberam a terapia celular. Análise Estatística: As médias foram comparadas por ANOVA/Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas.

3.2.4. Análise Histopatológica

A análise histopatológica revelou que no GC as alterações encontradas foram degeneração hidrópica tubular, acúmulo de proteína intratubular, necrose/apoptose tubular com medianas de 0,5, 0,25, 0,75, respectivamente (Figura 5A).

Nos grupos GN e GN + CTM as alterações observadas foram tubulite, degeneração hidrópica tubular, acúmulo de proteína tubular, glomerulite, infiltrado intersticial, fibrose intersticial, esclerose glomerular e apoptose/necrose tubular com medianas 0,5 e 1; 1,25 e 0,75; 0,75 e 0,75; 0,5 e 0,5; 1,25 e 0,75; 0,75 e 0,25; 0,5 e 0,25; 0,5 e 0,5 respectivamente (Figura 5A, Figura 6).

Não houve diferença estatisticamente significativas entre os grupos. No entanto, pode-se perceber uma tendência à redução de degeneração hidrópica tubular, infiltrado intersticial, fibrose intersticial e esclerose glomerular no grupo que recebeu o transplante das CTM (Figura 5A). No entanto, quando foi realizada uma análise global dos danos histológicos foi observado aumento significativo ($p<0,05$) de 6,13x do GN

em relação ao GC e uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de 4,25x do GN + CTM em relação ao GN (Figura 5B).

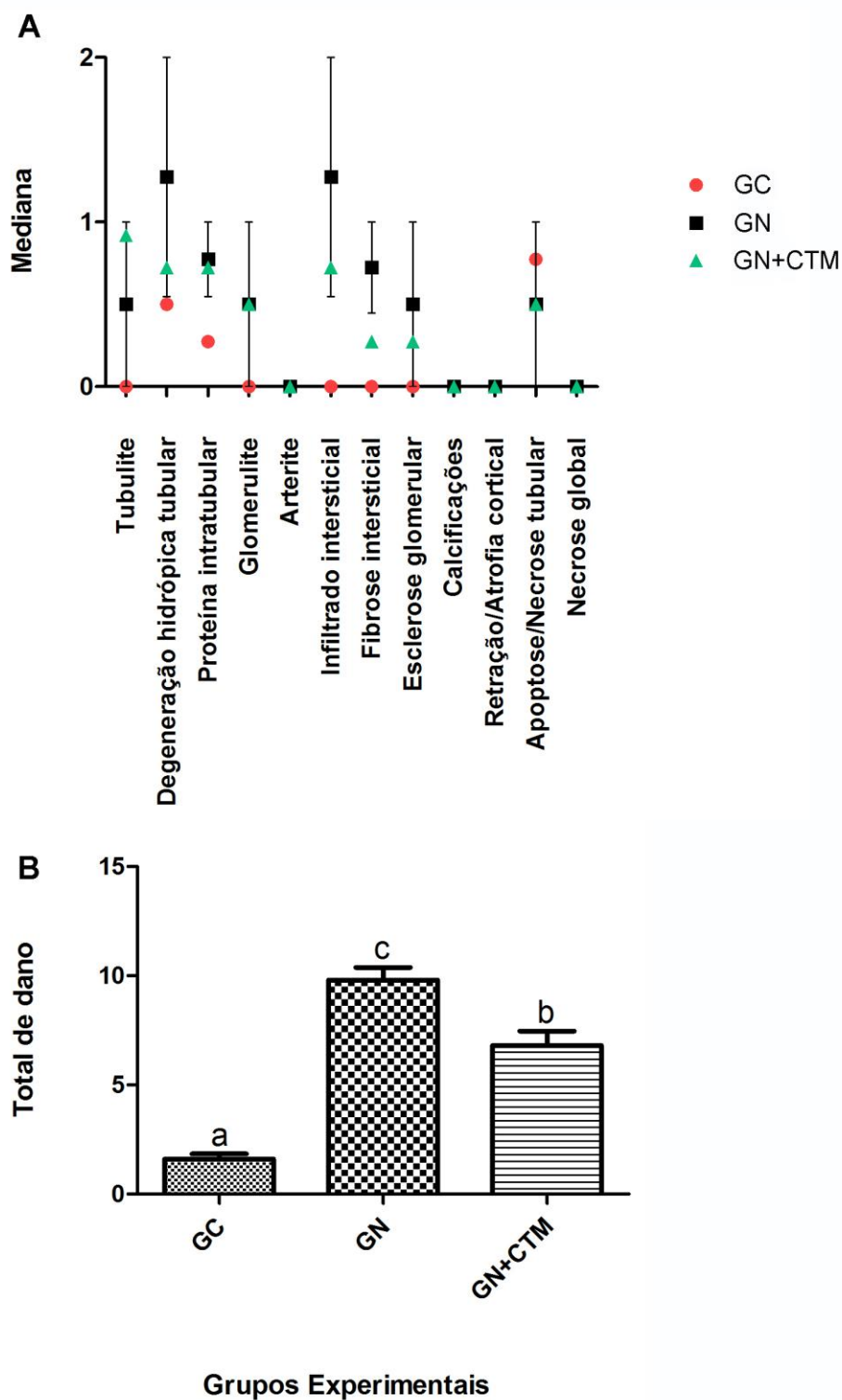


Figura 5 - Mediana e desvio padrão do escore das alterações histopatológicas dos cortes transversais de rins segundo a classificação Banff 97 (A) e avaliação do dano global (somatório de todos os danos classificados de acordo com Banff 97) (B). GC – Grupo Controle - avaliação 30 dias após o tratamento

com PBS 1ml/100g (p.c.; i.p.). GN – Grupo Nefrotoxicidade - avaliação 30 dias após o tratamento com cisplatina (4mg/Kg, p.c., i.p.); GN + CTM – Grupo Nefrotoxicidade + Célula Tronco Mesenquimais - avaliação 30 dias após o tratamento com cisplatina na concentração de 4 mg/Kg (p.c., i.p.) e terapia celular com CTM (i.v.) realizada, pela veia caudal, 24 horas após a última administração i.p. de cisplatina (Análise Estatística: Teste Estatístico Kruskal-Wallis/Dunn; $p>0,05$).

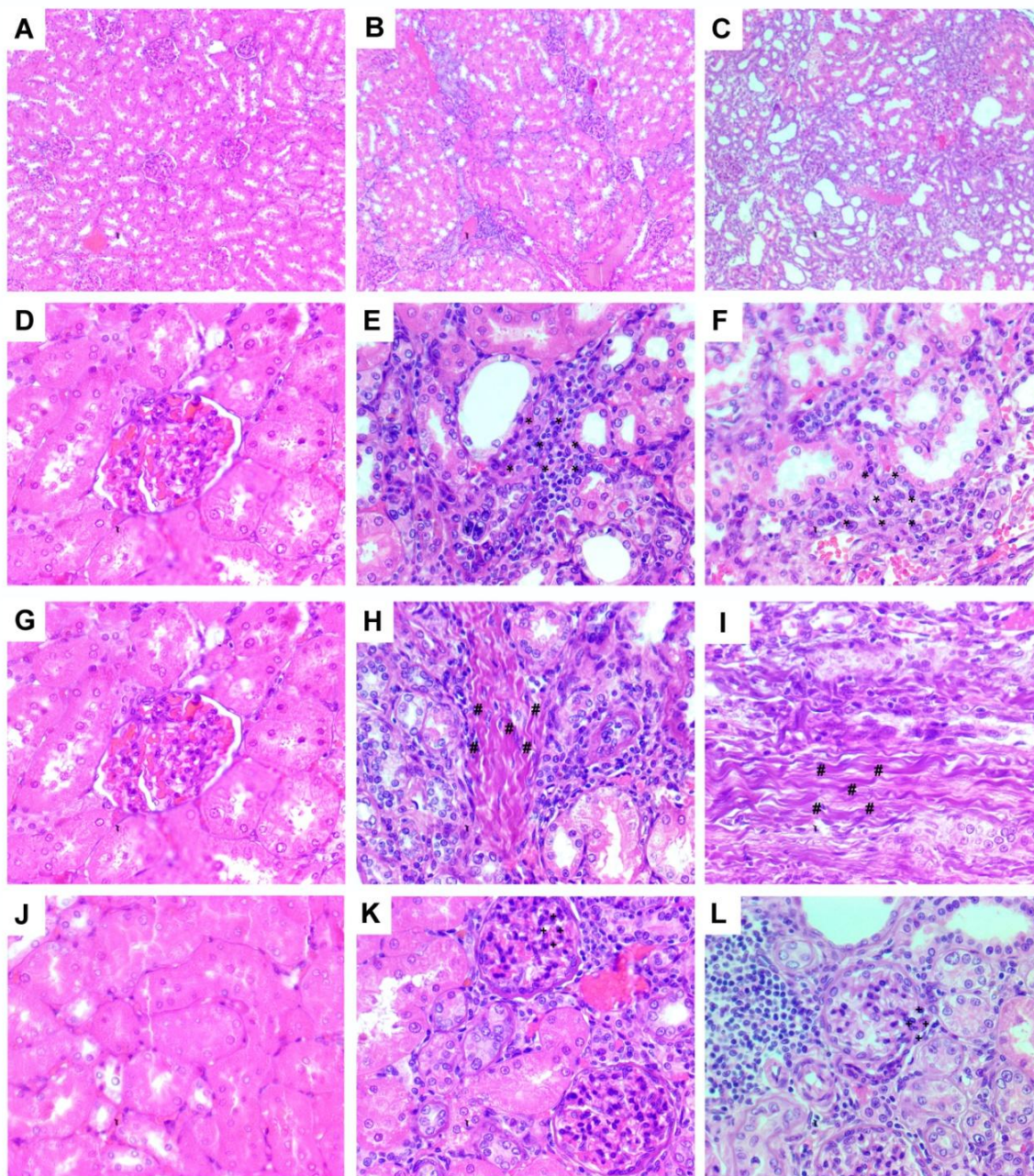


Figura 6 - Cortes histológicos do tecido renal dos animais dos grupos experimentais GC (A, D, G e J), GN (B, E, H e K) e GN + CTM (C, F, I e L). As figuras A, B e C visão geral do tecido dos grupos GC, GN e GN + CTM. As figuras E e F indicam infiltrado intersticial (*). Já as figuras H e I demonstram fibrose intersticial (#) e as figuras K e L indicam esclerose glomerular (+). Aumento de 100x nas figuras A, B e C e de 400x nas figuras D e L.

5. Discussão

A lesão renal aguda pode determinar a perda gradual da função renal desencadeando aumento da mortalidade ou o desenvolvimento de uma doença crônica que correlaciona-se diretamente a morbididades (SARNAK *et al.*, 2003) além de altos custos para os sistemas de saúde visto que o paciente renal crônico necessita de diálise e/ou transplante renal (NARGESI *et al.*, 2017). Logo novas estratégias de prevenção de dano renal são necessárias para prevenir a progressão da LRA para um dano renal crônico. Nesse contexto se insere a terapia celular com CTM.

No presente estudo para avaliar os efeitos dessa terapia celular utilizou-se o modelo de lesão renal aguda causada por medicamentos. Um dos medicamentos descritos como capazes de causar essas lesões renais é o quimioterápico cisplatina (PATTSCHAN *et al.*, 2018; NARGESI *et al.*, 2017). A cisplatina é um agente quimioterápico utilizado no tratamento do câncer (ALBERTON; SCHOR, 2015).

Para o desenvolvimento do protocolo de indução da LRA foi utilizado o protocolo de Canta *et al.* (2011) desenvolvido inicialmente em ratos Wistar machos. A comprovação da LRA se fez pelo aumento significativo da ureia e creatinina em associação com danos histológicos tais como tubulite, degeneração hidrópica, proteína intratubular, glomerulite, infiltrado intersticial, fibrose intersticial, esclerose glomerular e apoptose/necrose global. Esses achados bioquímicos e histológicos também são reportados em outros estudos de LRA (HE *et al.*, 2019; NARGESI *et al.*, 2017; PATTSCHAN *et al.*, 2018; YAMAKI *et al.*, 2012;) o que corrobora os dados encontrados e a eficiência da cisplatina em causar nefrotoxicidade.

Uma vez o protocolo de indução da LRA tendo sido efetivo o desafio do presente estudo foi avaliar se o transplante de CTM poderia melhorar a função renal e recuperar os danos histológicos causados pela cisplatina. Nossos resultados demonstram que o transplante de $1,0 \times 10^6$ células, dentro do período de 30 dias, foi eficiente em reestabelecer a função renal visto que os níveis séricos de ureia e creatinina reduziram nos animais transplantados se comparados com os animais que só receberam a cisplatina e além disso níveis de ureia e creatinina se igualaram aos animais não tratados com o quimioterápico. Esse fato sugere mudanças na função renal e infere-se melhoria da capacidade de filtração dos rins em função da terapia celular. Resultados

semelhantes já foram reportados na literatura para outros modelos experimentais e para outras formas de indução da LRA (CHEN *et al.*, 2011; KO *et al.*, 2018; PATSCHAN *et al.*, 2018).

Além da melhora da função renal a terapia celular foi capaz de reduzir a frequência global de danos histológicos. Essa redução foi estatisticamente significativa e também já estava relatada em outros modelos pré-clínicos. Segundo Lin *et al.* (2016); Nargesi *et al.* (2017); Patschan *et al.* (2018).

Esses resultados demonstram que a terapia celular com células tronco mesenquimais podem ser uma boa alternativa para o tratamento da LRA dentro de um espaço de tempo de 30 dias. Acredita-se que as CTM possam agir por duas vias principais que são a (I) regeneração e o (II) efeito parácrino. Segundo Little *et al.* (2018), a regeneração se dá quando as CTM se dirigirem ao local da lesão aderem ao tecido e se transdiferenciam. Esse fato pode ocorrer porque o próprio tecido lesionado produz fatores de crescimento e fatores diferenciadores que induzem as CTM a se transformarem no tecido do órgão que necessita da regeneração. Já a ação parácrina se dá quando as CTM migram até o local da lesão e produzem fatores reparadores endógenos, fatores anti-inflamatórios e antiapoptóticos que auxiliam na recuperação do órgão/tecido lesionado, porém sem acontecer a integração da CTM à matriz tecidual (SOUZA *et al.*, 2010).

Apesar de ainda não haver consenso na literatura sobre qual é a principal ação das CTM de medula óssea na recuperação do tecido renal, acredita-se que essas duas formas de ação podem justificar os achados descritos por esse estudo. Assim, diante dos resultados apresentados, infere-se que a terapia celular com células tronco mesenquimais seja uma possibilidade de escolha para o tratamento da lesão renal aguda. Destaca-se ainda que essa terapêutica poderá trazer benefícios para a prática clínica, inclusive para pacientes em tratamento oncológico com uso da cisplatina, já que o modelo pré-clínico reforça a possibilidade de uso em humanos em um futuro próximo.

REFERÊNCIAS

- Albertoni, G., Schor, N. Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease-mini-review. *Brazilian Journal of Nephrology*, v. 37(1), p. 106-114, 2015.
- Alves, J. E. D.. A transição demográfica e a janela de oportunidade. São Paulo: Instituto Fernand Braudel de Economia Mundial, 2008. 13p.
- Bittencourt, R.A.C., Pereira, H.R., Felisbino, S. L., Murador, P., De Oliveira, A. P. E., & Deffune, E. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. *Acta Ortopédica Brasileira*, p. 22-24, 2006
- Canta, A., Chiorazzi, A., Carozzi, V., Meregalli, C., Oggioni, N., Sala, B., Crippa, L., Avezza, F., Forestieri, D., Rotella, G., Zucchetti, M., Cavaletti, G. In vivo comparative study of the cytotoxicity of a liposomal formulation of cisplatin (lipoplatin™). *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 68(4), p. 1001-1008, 2011.
- Chen, Y. T., Sun, C. K., Lin, Y. C., Chang, L. T., Chen, Y. L., Tsai, T. H., Chung, S. Y., Chua, S., Kao, Y. H., Yen, C. H., Shao, P. L., Chang, K. C., Leu, S., Yip, H. K. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. *Journal of translational medicine*, v. 9(1), p. 51, 2011.
- Fry, A. C., Farrington, K. Management of acute renal failure. *Postgraduate medical journal*, v. 82, p. 106-116, 2006.
- Gordon, J. A.; Gattone 2nd, V. H.. Mitochondrial alterations in cisplatin-induced acute renal failure. *Am. J. Physiol.*, v. 250, p. F991-F998, 1986.
- He, L., Li, J., Zhan, J., Yi, F., Fan, X., Wei, Y., Zhang, W. The value of serum cystatin C in early evaluation of renal insufficiency in patients undergoing chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, p. 1-11, 2019.
- Holcombe, D.; Feeley, N. K.. Insuficiência renal. In: Morton, P. G.; Fontaine, D. K.; Hudak, C. M.; Gallo, B. M.. *Cuidados críticos de enfermagem: uma abordagem holística*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 698-724, 2008.
- Hoste, E. A.; Schurgers, M.. Epidemiology of acute kidney injury: How big is the problem? *Crit. Care Med.*, v. 36, p.S146-S151, 2008.
- Humphreys, B. D.; Soiffer, R. J.; Magee, C. C.. Renal failure associated with cancer and its treatment: An update. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 16, p.151-161, 2005.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estudos e pesquisas: informações demográficas e socioeconômica. Número 24. *Projeção da população do Brasil por sexo e idade 1980-2050*. Revisão 2008. 2008. Disponível em:

<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv41229.pdf>. Acessado em: 22 Jun 2017.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Projeção da População do Brasil**. 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/30082004projecaopopulacao.shtm>. Acessado em: 22 Jun 2017.

Ko, S. F., Chen, Y. T., Wallace, C. G., Chen, K. H., Sung, P. H., Cheng, B. C., Huang, T. H., Chen, Y. L., Chang, H. W., Lee, M. S., Yang, C. C., Yip, H. K. Inducible pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell therapy effectively protected kidney from acute ischemia-reperfusion injury. *American journal of translational research*, v. 10(10), p. 3053, 2018.

Leone, E. T.; Maia, A. G.; Baltar, P.E.. Mudanças na composição das famílias e impactos sobre a redução da pobreza no Brasil. *Econ. Soc.*, v. 19, p. 59-77, 2010.

Lin, K. C., Yip, H. K., Shao, P. L., Wu, S. C., Chen, K. H., Chen, Y. T., Yang, C. C., Sun, C. K., Kao, G. S., Chen, S. Y., Chai, H. T., Chang, C. L., Chen, C. H., Lee, M. S. Combination of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes for protecting kidney from acute ischemia–reperfusion injury. *International journal of cardiology*, v. 216, p. 173-185, 2016.

Meireles, L.S., Nardi, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *British Journal of Hematology*. USA, v. 123, p. 702-711, 2003.

Miranda, G. M. D.; Mendes, A. C. G.; Silva, A. L. A.. O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.*, v. 19, p. 507-519, 2016.

Monteiro, B. S. Tratamento de defeitos críticos em calvária de camundongos com células-tronco mesenquimais associadas ou não ao plasma rico em plaquetas. 2009. (Tese de doutorado) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, MG.

Nargesi, A. A., Lerman, L. O., Eirin, A. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for kidney repair: current status and looming challenges. *Stem cell research & therapy*, v. 8(1), p. 273, 2017.

Oliveira, F. C.; Alves, M. D. S.. Co-morbidades e mortalidade de pacientes com doença renal: atendimento terceirizado de nefrologia. *Acta Paul. Enferm.*, v. 22, p. 476-480, 2009.

Patschan, D., Buschmann, I., Ritter, O., Kribben, A. Cell-Based Therapies in Acute Kidney Injury (AKI). *Kidney and Blood Pressure Research*, v. 43(3), p. 673-681, 2018.

Pesarini, J. R., de Oliveira, E. J. T., Pessatto, L. R., Rabacow, A. P. M., Camassola, M., dos Santos, B. P., Barros, M. E., Cantero, W. B., Antonioli-Silva, A. C. M. B., Oliveira, R. J. Calcitriol combined with calcium chloride causes apoptosis in undifferentiated adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells, but this effect decreases during adipogenic differentiation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 108, p. 914-924, 2018.

Pesarini, J. R., Oliveira, R. J., Pessatto, L. R., Antonioli-Silva, A. C. M. B., Felicidade, I., Nardi, N. B., Camassola, M., Mantovani, M. S., & Ribeiro, L. R. (2017). Vitamin D: Correlation with biochemical and body composition changes in a southern Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 91, p. 861-871, 2017

Pontes, L.B.; Antunes, Y. P. P. V.; Bugano, D. D. G.; Karnakis, T.; del Giglio, A.; Kaliks, R. A.. Prevalência de insuficiência renal em pacientes idosos com câncer em um centro de tratamento oncológico. *Einstein*, v. 12, p. 300-303, 2014.

Racusen, L. C.; Solez, K.; Colvin R. B.; Bonsib S. M.; Castro, M. C.; Cavallo, T.; Croker B. P.; Demetris, A. J.; Drachenberg C. B.; Fogo, A. B.; Furnes, P.; Gaber, L. W.; Gibson, D. G.; Goldberg, J. C.; Grande, J.; Halloran, P. F.; Hansen, H. E.; Hartley, B.; Hayry, P. J.; Hill, C. M.; Hoffman, E. O.; Hunsicker, L. G.; Lindblad, A. S.; Marcussen, N.; Mihatsch, M. J.; Nadasdy, T.; Nickerson, P.; Olsen, T. S.; Papadimitiou, J. C.; Randhawa, P. S.; Rayner, D. C.; Roberts, I.; Rose, S.; Rush, D.; Salinas-Madrigal, L.; Salomon, D. R.; Sund, S.; Taskinen, E.; Trpkov, K.; Yamaguchi, Y..The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.*, v. 55, p. 713-723, 1999.

Ren, L.; Zhou, Q.; Hou, M.; Qiu, M.; He, J.; Chen, H.. Monitoring of the renal function changes during chemotherapy based on high-dose cisplatin in patients with lung cancer.

Ries, L.; Kosary, C.; Hankey, B.. SEER Cancer Statistics Review, 1975-1995. Bethesda, MA: National Cancer Institute. 1998.

Santos, E. R.; Matos, J. D.. Perfil epidemiológico dos pacientes com injúria renal aguda em uma Unidade de Terapia Intensiva. *ACM Arq. Catarin. Med.*, v. 37, p. 7-11, 2008.

Santos, E. S.; Marinho, C. M. S.. Principais causas de insuficiência renal aguda em unidades de terapia intensiva: intervenção de enfermagem. *Rev. Enf. Ref.*, n. 9, p. 181-189, 2013.

Santos, N. Y.; Zorzenon, C. P. F.; Araújo, M. F.; Balbi, A. L.; Ponce. D.. Estudo prospectivo observacional sobre a incidência de injúria renal aguda em unidade de terapia intensiva de um hospital universitário. *J. Bras. Nefrol.*, v. 31, p. 206-211, 2009.

Sarnak, M. J., Levey, A. S., Schoolwerth, A. C., Coresh, J., Culleton, B., Hamm, L. L., McCullough, P. A., Kasiske, B. L., Kelepouris, E., Klag, M. J., Parfrey, P., Pfeffer, M., Raij, L., Spinosa, D. J. Wilson, P. W. American heart association councils on kidney in cardiovascular disease, high blood pressure research, clinical cardiology, and

epidemiology and prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in cardiovascular disease, high blood pressure research, clinical cardiology, and epidemiology and prevention. *Hypertension*, v. 42, p. 1050-1065, 2003.

SBN. Sociedade Brasileira de Nefrologia. Saúde do Rim para todos. 2019. Disponível em: <https://sbn.org.br/dia-mundial-do-rim/ano-2019/#fndtn-sobre>. Acessado em 03 Mar 2019.

Schrezenmeier, E. V., Barasch, J., Budde, K., Westhoff, T., Schmidt-Ott, K. M. Biomarkers in acute kidney injury—pathophysiological basis and clinical performance. *Acta physiologica*, v. 219(3), p. 556-574, 2017.

Serpeloni, J. M.; Batista, B. L.; Angeli, J. P.; Barcelos, G. R.; Bianchi, M. L.; Barbosa-Jr, F.; Antunes, L. M.. Antigenotoxic properties of chlorophyll b against cisplatin-induced DNA damage and its relationship with distribution of platinum and magnesium in vivo. *J. Toxicol. Environ. Health A*, v. 76, p. 345-353, 2013.

Sinanoglu, O.; Yener, A.N.; Ekici, S.; Mid, A.; Aksungar, F. B.. The protective effects of spirulina in cyclophosphamide induced nephrotoxicity and urotoxicity in rats. *Urology*, v. 80, p. 1392.e1-1392.e6, 2012.

Souza, C. F. D., Napoli, P. D., Han, S. W., Lima, V. C. D., Carvalho, A. C. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca?. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*, 2010.

Souza, M. L.; Rodrigues, F. S. M.; Ferraz, R. R. N.; Deus, R. B.; Malagutti, W.; Barnabé, A. S.; Francisco, L.; Nunes, R. S.. Incidência de insuficiência renal aguda e crônica como complicações de pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva. *Conscientiae Saúde*. V. 9, p. 456-461, 2010.

Sugumar, E.; Kanakasabapathy, I.; Abraham, P.. Normal plasma creatinine level despite histological evidence of damage and increased oxidative stress in the kidneys of cyclophosphamide treated rats. *Clin. Chim. Acta*, v. 376, p. 244-245, 2007.

Urt-Filho, A.; Oliveira, R. J.; Hermeto, L. C.; Pesarini, J. R.; David, N.; Cantero, W. B.; Falcão, G.; Marks, G.; Antonioli-Silva, A. C. M. B.. Mesenchymal stem cell therapy promotes the improvement and recovery of renal function in a preclinical model. *Genet. Mol. Biol.*, v. 39, p. 290-299, 2016.

Vasconcelos, A. M. N.; Gomes, M. M. F.. Transição demográfica: a experiência brasileira. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v. 1, p.539-48, 2012.

Valencia, J., Blanco, B., Yanez, R., Vásquez, M., Sanches, C.H., Fernandez-Garcia, M., Serrano, C.R.,

Wen, X.; Murugan, R.; Peng, Z.; Kellum, J.A.. Pathophysiology of acute kidney injury: A new perspective. *Contrib. Nephrol.*, v. 165, p.39-45, 2010.

Wildiers, H.; Higley, M. S.; de Bruijn, E. A.; van Oosterom, A. T. Pharmacology of anticancer drugs in the elderly population. Clin. Pharmacokinet. v. 42, p.1213-1242, 2003.

Yamaki, V. N., Gonçalves, T. B., Coelho, J. V. B., Pontes, R. V. S., Costa, F. L. D. S., Brito, M. V. H. Protective effect of remote ischemic pre-conditioning in the ischemia and reperfusion-induced renal injury in rats. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, v. 39(6), p. 529-533, 2012.

Zhongguo Fei Ai Za Zhi, v. 5, p. 363-365, 2002.