



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

WESLEM GARCIA SUHETT

**MODELO *EX-VIVO* DE AVALIAÇÃO DE  
NEFROTOXICIDADE:  
UMA NOVA ABORDAGEM PARA UMA ANTIGA TÉCNICA**

WESLEM GARCIA SUHETT

**MODELO *EX-VIVO* DE AVALIAÇÃO DE  
NEFROTOXICIDADE:  
UMA NOVA ABORDAGEM PARA UMA ANTIGA TÉCNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S947m Suhett, Weslem Garcia.

Modelo ex-vivo de avaliação de nefrotoxicidade : uma nova abordagem para uma antiga técnica / Weslem Garcia Suhett. - Londrina, 2019.  
127 f. : il.

Orientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Suíno - Tese. 2. Nefrotoxicologia - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. I. Bracarense, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 63

WESLEM GARCIA SUHETT

**MODELO *EX-VIVO* DE AVALIAÇÃO DE  
NEFROTOXICIDADE:  
UMA NOVA ABORDAGEM PARA UMA ANTIGA TÉCNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina  
como requisito parcial para a obtenção do título de  
Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Orientador: Dr.(a) Ana Paula Frederico  
Rodrigues Loureiro Bracarense  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr.(a) Giovana Wingeter Di Santis  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr.(a) Danielle Venturini  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr.(a) Joice Sifuentes Dos Santos  
Universidade Norte do Paraná

---

Prof. Dr. Lucas Alécio Gomes  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 18 de Setembro de 2019.

Dedico este trabalho, aos inúmeros pacientes renais crônicos humanos e animais, em decorrência a exposição nefrotoxinas invisíveis e desconhecidas.

## AGRADECIMENTOS

Início esta parte pré-textual agradecendo a Deus, pois muitos dizem que a ciência e a fé andam por caminhos distintos, eu vejo por outro lado, elas se completam ajudam aceitar o incompreendido, te instigam a prosseguir e pela minhas crenças e fé consegui chegar até aqui.

Agradeço à minha orientadora não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade. Me acolheu em um momento de total desestímulo pela ciência, pesquisa e área acadêmica e reacendeu com seu exemplo, esse brilho no olhar das novas descobertas, me ensinou que tudo tem suas aproximações sucessivas e que através delas venceria meus medos, me ensinou ser uma pessoa melhor, me ensinou ser um aluno melhor, me ensinou ser um professor melhor. Foi durante estes quatro anos, um porto seguro, até para pedir conselhos pessoais, quando a figura de mãe estava distante. Por tudo isso deixo registrado um agradecimento que não existem palavras que consigam expressar.

Essa jornada não foi árdua, mas foi laborosa com muitos altos e baixos, desafios a serem vencidos e com certeza as vitórias só foram alcançadas em decorrência do apoio de minha família. Portanto agradeço à minha esposa Laís Beiriz Rocha Suhett, companheira que compreendia os passeios que deixamos de fazer, os filmes que não assistimos, entre outros momentos, pois tinha que estudar, escrever, pesquisar entre muitos outros verbos que envolvem fazer um doutorado, por isso te amo a cada dia mais.

Aos meus pais Idelson e Doriza, aos meus sogros Luís, Sonia, Simone e Sérgio, ao meu irmão Wevison, Cunhados(as) Dayanne, Sérgio e Taíza e meu sobrinho Pedro muito obrigado por acreditarem que eu conseguiria me dando forças de diferentes formas. A toda minha gigante família de primos, tios, avô, avó espero continuar sendo orgulho para cada um com diferentes expressões de amor que me impulsionam a progredir.

Sair da segurança do lar de seus pais nunca é fácil, mas te faz amadurecer, conhecer novas possibilidades, enfrentar novos desafios e o doutorado é um deles e com ele grandes amizades foram construídas, seria impossível citar todos, mas agradeço aos amigos Valdair, Fernanda e Mariah que estiveram juntos no início dessa jornada e a tornaram mais leve, e através de vocês, amplio meu agradecimento a cada residente que se tornou amigo e colega de profissão.

Às minhas amigas de doutorado e laboratório Juliana Rubira e Leila Maidana, muito obrigado por auxiliaram em cada etapa desse trabalho e por vocês agradeço a cada aluno

de iniciação científica ou estagiário, residentes, mestrandos, doutorandos, pós-doutorandos, funcionários e docentes da patologia animal, que viram este trabalho nascendo, crescendo e concluindo com a ajuda direta ou indireta de cada um.

Agradeço a minha amiga Camila Bizarro que conseguia até nos dias mais tristes, cansativos e duros me fazer sorrir. Esta amizade veio com o doutorado, cresceu com o COPESAH, como muitas outras que registro aqui indistamente meu agradecimento, e com certeza vou levar para vida toda.

Durante o doutorado outros desafios apareceram como a de se tornar docente na Universidade Estadual de Londrina e com os desafios também vem as inspirações e amizades e dois presentes foram Fernanda e Priscila, jovens docentes, que amam o que fazem e me inspiram a inovar no ensino, assim como cada colega dos Departamentos de Clínicas Veterinárias e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva que até nos puxões de orelha me ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço a cada londrinense que me acolheu durante estes anos e principalmente uma que se tornou uma grande amiga, quase irmã Emily que veio através do curso de francês e hoje é madrinha de casamento e faz parte dessa história.

Gostaria de agradecer também algumas pessoas que contribuíram para que essa vitória se tornasse realidade, essas pessoas são funcionários, enfermeiros, técnicos, secretários, auxiliares de serviços gerais da UEL e do Hospital Veterinário, que manifesto meu agradecimento através da carinhosa Helenice.

E por, mas não menos importante agradeço a cada animalzinho que passou na minha vida sendo paciente, ou apenas um amigo tudo isso é por vocês e alguns se tornaram tão especiais que conquistaram espaço de filhos no meu coração, as minhas filhas de quatro patas Nuit e Zara, obrigado por cada ronronar, lambida, latido e miado que alegram os meus dias.

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.” (Robert Collier)*

SUHETT, Weslem Garcia. **Modelo *Ex-Vivo* de Avaliação de Nefrotoxicidade**: Uma nova abordagem para uma antiga técnica. 2019. 134p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Os rins apresentam um papel essencial na manutenção da homeostase, portanto o conhecimento sobre os efeitos tóxicos de xenobióticos sobre os mesmos, bem como os mecanismos de lesão apresentam relevância científica. A avaliação da nefrotoxicidade utiliza principalmente animais de laboratório, no entanto são necessárias alternativas à avaliação *in vivo*. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar e padronizar a utilização de explantes renais de suínos para ensaios toxicológicos. Foram avaliados 576 explantes renais obtidos de oito suínos de terminação e oito leitões de 24 dias. Os explantes foram divididos em: controle zero horas (C0), controle 4 horas (C4), grupo exposto ao ácido fítico (5  $\mu$ M) (AF), grupo exposto a gentamicina (1,05 M) (EG), grupo exposto ao DON (10  $\mu$ M) (EDON) e grupo exposto ao DON (10  $\mu$ M) mais ácido fítico (5  $\mu$ M) (EDONAF). Após a incubação, os explantes foram fixados e processados para análise histológica. Estabeleceu-se escore lesional de acordo com a intensidade e gravidade das alterações histológicas. O estresse oxidativo foi avaliado pelos métodos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), redução do ferro (FRAP), 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e glutatona reduzida (GSH). Os biomarcadores de gama-glutamilttransferase (GGT) e creatinina foram quantificados no sobrenadante do meio de cultura. O escore lesional para C0 (1,38 $\pm$ 0,37) e C4 (2,33 $\pm$ 0,33) não apresentaram diferença significativa. Observou-se aumento do escore nos explantes expostos à gentamicina (7,37 $\pm$ 0,68) e expostos ao DON (4,57 $\pm$ 0,5) em comparação aos grupos controles. A GGT evidenciou maior atividade frente aos agentes agressores EDON (8,67 $\pm$ 0,32 UI/L) e EG (15,7 $\pm$ 2,1UI/L) e redução quando o ácido fítico presente no meio EDONAF (5,35 $\pm$ 0,32 UI/L). Na avaliação do estresse oxidativo, observou-se a capacidade antioxidante do ácido fítico com melhores respostas do grupo AF em relação ao grupo C4 nos testes ABTS e FRAP, demonstrando efeito protetor do ácido fítico com redução do estresse oxidativo e melhora na capacidade antioxidante do grupo EDONAF em relação ao grupo EDON vistos no teste de GSH. Os resultados indicaram que o modelo de explante renal de suínos é adequado para avaliar os efeitos de substâncias tóxicas sobre o tecido renal, além de ser uma alternativa ao modelo *in vivo*, atendendo as necessidades éticas atuais que preconizam a redução do número de animais utilizados em pesquisas.

**Palavras-chave:** creatinina, gama-glutamilttransferase, rins, escore de lesão, estresse oxidativo, explantes

SUHETT, Weslem Garcia. **Ex-Vivo Model of Nephrotoxicity Assessment:** A new approach to an old technique. 2019. 134p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

The kidneys play an essential role in the maintenance of homeostasis, so knowledge about the toxic effects of xenobiotics on the kidneys as well as the mechanisms of injury have scientific relevance. The evaluation of nephrotoxicity frequently uses laboratory animals, however, alternatives to in vivo evaluation are necessary. Therefore, the objective of this work was to evaluate and standardize the use of renal explants of swines for toxicological tests. 576 kidney explants obtained from eight finishing pigs and eight 24 day piglets were evaluated. The explants were divided in: control zero hours (C0), control 4 hours (C4), group exposed to phytic acid (5  $\mu$ M) (AF), group exposed to gentamicin (1.05 M) (EG), group exposed to DON (10  $\mu$ M) (EDON) and group exposed to DON (10  $\mu$ M) plus phytic acid (5  $\mu$ M) (EDONAF). After incubation the explants were fixed and processed for histological analysis. A lesion score was established according to the severity and severity of the histological changes. Oxidative stress was evaluated by methods of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), iron reduction (FRAP), 2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and reduced glutathione (GSH). The gamma-glutamyltransferase (GGT) and creatinine biomarkers were quantified in the culture medium supernatant. The lesion score C0 ( $1.38 \pm 0.37$ ) and C4 ( $2.33 \pm 0.33$ ) showed no significant difference. An increase in the score was observed in explants exposed to gentamicin ( $7.37 \pm 0.68$ ) and exposed to DON ( $4.57 \pm 0.5$ ) in comparison to the control groups. GGT showed a higher expression of EDON ( $8.67 \pm 0.32$  IU/L) and EG ( $15.7 \pm 2.1$  IU/L) and a reduction when phytic acid was present in the EDONAF medium ( $5.35 \pm 0.32$  IU/L). In the evaluation of the oxidative stress, we observed the antioxidant capacity of phytic acid with better AF group responses in relation to the C4 group in the ABTS and FRAP tests showing phytic acid protective effect with oxidative stress reduction and improvement in the antioxidant capacity of the EDONAF group in relation to the EDON group seen in the GSH test. The results indicate that the model of renal explants of is adequate to evaluate the effects of toxic substances on the renal tissue, besides being an alternative to the in vivo model, meeting the current ethical needs that recommend the reduction of the number of animals used in researches.

**Key words:** creatinine, gamma-glutamyltransferase, kidneys, injury score, oxidative stress, explants

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO A

<b>Figura 1</b> – Expression of the Biomarkers .....	82
<b>Figura 2</b> – Effects of gentamicin on histological kidney explant.....	86

### ARTIGO B

<b>Figura 1</b> – Diagrama de escore de lesão histológica renal .....	99
<b>Figura 2</b> – Escore de lesão tecidual renal .....	113
<b>Figura 3</b> – Avaliação de estresse oxidativo e capacidade antioxidante .....	116

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Tabela 1</b> – Sistema de classificação para Insuficiência Renal Aguda .....	27
---	----

#### ARTIGO A

<b>Table 1</b> – Establishment of a lesion score .....	79
<b>Table 2</b> – Morphology and morphometry of kidney explants .....	85
<b>Table 3</b> – Oxidative stress response of kidney explants.....	88

#### ARTIGO B

<b>Tabela 1</b> – Concentração de creatinina (mg/dL) no sobrenadante.....	102
<b>Tabela 2</b> – Atividade da $\gamma$ -glutamilttransferase (GGT) (U/L) no sobrenadante.....	102
<b>Tabela 3</b> – Morfometria glomerular de explantes renais.....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Alanina aminopeptidase
ABTS	2, 2'-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) assay
AF	Grupo exposto ao ácido fítico
AFL	Aflatoxina
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
BEN	Nefropatia endêmica dos Balcãs
COX	Ciclooxigenase
COX1	Isoenzima ciclooxigenase 1
COX2	Isoenzima ciclooxigenase 2
CTRL0	Grupo controle zero horas
CTRL4	Grupo controle quatro horas
DAS	Diacetoxiscirpenol
DL50	Dose Letal de 50%
DMEM F12	Dulbecco Modified Eagle Medium F-12
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DON	Desoxinivalenol
DON1	Epóxi-desoxinivalenol
DRC	Doença Renal Crônica
EDON	Grupo exposto a desoxinivalenol
EDONAF	Grupo exposto a desoxinivalenol e ácido fítico
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EG	Grupo exposto a gentamicina
EGAF	Grupo exposto a gentamicina e ácido fítico
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
FA	Fosfatase Alcalina
FAC	Fosfatase ácida
FB	Fumonisinias
FRAP	Ferric reducing antioxidant power assay

FUSX	Fusarenona X
GGT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
GSH	Reduced Glutathione assay
IL-18	Interleucina 18
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IRA	Insuficiência Renal Aguda
IRIS	International Renal Interest Society
JNK	Jun-Terminal Kinase
kDa	Kilodalton
KIM-1	Glicoproteína transmembrana do tipo 1
LAP	Leucina aminopeptidase
LDH	Lactato desidrogenase
L-FABP	Fração Hepática das Proteínas ligadas a ácidos graxos
LRA	Lesão Renal Aguda
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitogenos
MDA	Malondialdehyde
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NAG	N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosamidase
NBT	Nitroblue tetrazolium assay
NGAL	Lipocaína associada a gelatinase neutrofílica
NIV	3-acetil-deoxinivalenol e nivalenol
NTA	Necrose Tubular Aguda
NTA	Necrose tubular aguda
OTA	Ocratoxina A
PAT	Patulina
PCR	Proteína C reativa
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaglandina I2
PMB	Proteína de peso molecular baixo
PME	Proteína de peso molecular elevado

PMI	Proteína de peso molecular intermediário
PTH	Paratormônio
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
TBARS	Thiobarbituric acid reative substances assay
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
ZEA	Zearalenona
$\beta$ -Gal	$\beta$ -galactosidase
$\beta$ -Glu	$\beta$ -glucuronidase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	22

### CAPÍTULO 1

2.1	ANATOMO-FISIOLOGIA RENAL.....	22
2.1.1	Unidade Funcional do Rim: O Néfron.....	23
2.2	NEFROPATIAS.....	23
2.2.1	Doença Renal Crônica.....	24
2.2.2	Insuficiência Renal Aguda.....	26
2.3	MARCADORES DE LESÃO RENAL .....	28
2.3.1	N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidase.....	33
2.3.2	Gama-Glutamiltransferase.....	34
2.3.3	Cistatina C.....	35
2.3.4	Lipocaína Associada à Gelatinase Neutrofílica.....	36
2.3.5	Glicoproteína Transmembrana do Tipo 1.....	37
2.3.6	Interleucina 18.....	37
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO NA LESÃO RENAL .....	38
2.5	O ÁCIDO FÍTICO COMO SUBSTÂNCIA ANTIOXIDANTE.....	40

### CAPÍTULO 2

2.6	MODELO EX-VIVO DE AVALIAÇÃO RENAL .....	42
2.6.1	Vantagens da Técnica.....	43
2.6.2	Limitações da Técnica.....	44
2.7	AGENTES NEFROTÓXICOS .....	45
2.7.1	Antibióticos.....	46
2.7.1.1	Gentamicina.....	46

2.7.1.2	Anfoterecina B.....	47
2.7.1.3	Polimixinas.....	48
2.7.2	Micotoxinas.....	49
2.7.2.1	Tricotecenos.....	51
2.7.2.2	Ocratoxina A.....	54
2.7.3	Antinflamatórios Não-Esteroidais.....	56
2.8	REFERÊNCIAS REVISÃO DE LITERATURA.....	58
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>74</b>
3.1.1	Objetivo Geral.....	74
3.1.2	Objetivos Específicos.....	74
<b>4</b>	<b>ARTIGO A – STANDARDIZATION OF THE KIDNEY EXPLANT TECHNIQUE FOR TOXICOLOGICAL TESTS</b> .....	<b>75</b>
	ABSTRACT .....	75
	KEY-WORDS.....	75
4.1	INTRODUCTION.....	76
4.2	MATERIAL AND METHODS.....	77
4.2.1	Explants .....	77
4.2.2	Biochemical analysis .....	78
4.2.3	Histological and morphometrical analysis.....	79
4.2.4	Oxidative stress response.....	79
4.2.5	Statistical analysis .....	81
4.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	81
4.3.1	Biochemical analysis .....	81
4.3.2	Histological and morphometrical analysis.....	83
4.3.3	Oxidative stress response.....	87
4.4	CONCLUSION.....	89
4.5	REFERÊNCIAS.....	89

<b>5</b>	<b>ARTIGO B – ÁCIDO FÍTICO MODULA TOXICIDADE INDUZIDA POR DESOXINIVALENOLEM EXPLANTES RENAI</b> .....	<b>92</b>
	RESUMO .....	92
	PALAVRAS-CHAVE.....	92
	ABSTRACT.....	93
	KEY-WORDS .....	93
5.1	INTRODUÇÃO.....	94
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	97
5.2.1	Animais.....	97
5.2.2	Modelo experimental.....	97
5.2.3	Biomarcadores renais.....	98
5.2.4	Avaliação histológica.....	98
5.2.5	Estresse oxidativo.....	99
5.2.6	Análise estatística.....	100
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	101
5.3.1	Biomarcadores de lesão renal.....	101
5.3.2	Histologia e morfologia renal.....	111
5.3.3	Estresse oxidativo e capacidade antioxidante.....	115
5.4	CONCLUSÃO.....	117
5.5	REFERÊNCIAS.....	117
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>123</b>
7.1	ANEXO A: ORIENTAÇÃO AOS AUTORES REVISTA ALTEX.....	123

## 1 **1 INTRODUÇÃO**

2  
3 Os rins apresentam um papel essencial na manutenção da homeostase,  
4 pois desempenham função exócrina, pela eliminação de substâncias tóxicas provenientes  
5 do metabolismo e função endócrina, que está associada à produção de hormônios como a  
6 eritropoietina, renina, prostaglandinas e à síntese de vitamina D ativa (NELSON;  
7 COUTO, 2011).

8 Quando essas funções renais começam a falhar, tem-se uma disfunção  
9 renal, que pode ser crônica ou aguda. Entre as disfunções renais, as mais abordadas são a  
10 doença renal crônica e a insuficiência renal aguda. A doença renal crônica (DRC) é uma  
11 afecção comumente observada em humanos, cães e gatos, sendo definida como perda da  
12 função da unidade estrutural dos rins, o néfron, provocando deste modo perda da  
13 capacidade de manter a homeostase, devido à redução da taxa de filtração glomerular,  
14 perda da capacidade de concentração da urina e diminuição da função endócrina (ROSA,  
15 *et al.*, 2015).

16 Entre as potenciais causas de doença renal crônica deve-se considerar  
17 doenças imunológicas, amiloidose, neoplasias, agentes nefrotóxicos, isquemia renal,  
18 pielonefrite, doenças congênitas e hereditárias e quadros infecciosos (NELSON;  
19 COUTO, 2011).

20 Os agentes infecciosos e tóxicos geralmente promovem lesões  
21 isquêmicas agudas, afetando tanto o glomérulo, quanto a porção tubular do néfron,  
22 levando a um quadro agudo de lesão renal, que pode evoluir para um quadro crônico.  
23 Assim, a sua detecção precoce facilita a apropriada intervenção para atenuar ou inibir o  
24 dano e o desenvolvimento de insuficiência renal aguda (GRAUER, 2005).

25 A insuficiência renal aguda é caracterizada pela perda da função renal  
26 de forma abrupta, sendo baseado nos níveis de creatinina sérica e diurese em 48 horas  
27 (ZATZ; SEGURO; MALNIC, 2011). Vem apresentando-se com maior frequência nas  
28 últimas décadas, muito relacionada ao aumento da expectativa de vida da população, bem  
29 como maior exposição a substâncias como contrastes iodados, imunossupressores, anti-  
30 inflamatórios, antibióticos, antifúngicos e antivirais (REWA; BAGSHAW, 2014).

31 Entre os agentes nefrotóxicos, os aminoglicosídeos têm destaque, pela  
32 sua utilização como agente antimicrobiano, mesmo que há décadas se conheça o seu  
33 potencial tóxico em diversas espécies como cães, gatos e cavalos (BROWN *et al.*, 1985;  
34 HARDY *et al.*, 1985; BROWN *et al.*, 1986). A gentamicina é o aminoglicosídeo que

1 frequentemente está associado a quadros de insuficiência renal aguda, sendo utilizada em  
2 infecções por bactérias gram-negativas, tendo, no entanto, grande potencial nefrotóxico e  
3 ototóxico (HARDY *et al.*, 1985; POLZIN *et al.* 1992).

4 A gentamicina tem sido utilizada frequentemente em diversos estudos  
5 de avaliação renal frente à lesão tóxica, pois promove uma necrose tubular aguda e difusa,  
6 com presença de cilindros granulosos e hialinos associados com variados graus de  
7 regeneração (BROWN *et al.*, 1986; POLZIN *et al.*, 1992; RUDOLPH; CORVALAN,  
8 1992; HENNEMANN *et al.*, 1997).

9 Outras substâncias, com provável potencial nefrotóxico que tem  
10 ganhado destaque, são as micotoxinas. São metabólitos secundários de fungos, que atuam  
11 em diferentes tecidos orgânicos induzindo lesão e morte celular (BASSO;  
12 BRACARENSE, 2013). Entre estas, pode se destacar a ocratoxina A (LIMONCIEL;  
13 JENNINGS, 2013), substância associada a quadros agudos de lesão tubular em humanos  
14 e suínos e que está presente em muitos alimentos (HOFFMANN *et al.*, 2010). Entretanto,  
15 alguns estudos indicam outras micotoxinas envolvidas na lesão renal como aflatoxina (LI  
16 *et al.*, 2018), citrininas (BRAUNBERG *et al.*, 1992) e desoxinivalenol (XIAO *et al.*,  
17 2013).

18 Para a avaliação da homeostase tecidual, não basta apenas conhecer o  
19 potencial tóxico de determinada substância; é necessário também determinar a toxicidade.  
20 Os níveis séricos de ureia e a creatinina são os indicadores mais comumente utilizados  
21 para indicar uma redução da taxa de filtração glomerular (TFG) ocasionada por diversos  
22 fatores, entretanto, isoladamente são considerados marcadores de baixa sensibilidade para  
23 o diagnóstico de lesão renal aguda, caracterizando-se como marcadores tardios (FINCO  
24 *et al.*, 1995; DiBARTOLA, 2000; KERR, 2003).

25 Atualmente, há interesse crescente na determinação de biomarcadores  
26 de lesão renal que sejam específicos e sensíveis, de forma a caracterizar precocemente a  
27 lesão renal. Deste modo, as enzimas urinárias têm ganhado destaque pela possibilidade  
28 de serem utilizadas como marcadores precoces de lesão renal, possibilitando a sua  
29 localização, pois diferentes porções do néfron expressam enzimas características. As  
30 enzimas urinárias também podem ser usadas para avaliar o grau de lesão renal por meio  
31 do aumento da sua atividade (CLEMO, 1998; ROSA *et al.*, 2014).

32 Na medicina veterinária, as enzimas urinárias têm sido primariamente  
33 utilizadas na avaliação de nefrotoxicidade aguda por serem testes sensíveis e não  
34 invasivos de lesão tubular renal. O aumento na atividade de enzimas urinárias foi

1 observado em nefropatias induzidas pela gentamicina, mesmo quando os testes de função  
2 renal são normais, o que sugere que as enzimas urinárias podem ser úteis na detecção de  
3 lesões renais precoces (HENNEMANN *et al.*, 1997).

4               Entre as enzimas com possibilidade de uso como biomarcadores renais  
5 destaca-se a enzima N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG), a qual está presente  
6 primariamente nas células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais e o aumento de  
7 sua atividade na urina está associado ao aumento da atividade lisossomal, sendo, portanto,  
8 um marcador sensível, específico e precoce de lesão renal (TASSINI *et al.*, 2015). Outra  
9 enzima de destaque na medicina veterinária é a gama-glutamyltransferase (GGT), que em  
10 cães é considerada um marcador precoce e persistente de lesão renal, uma vez que estudos  
11 demonstraram que sua atividade urinária antecede o aparecimento de proteinúria,  
12 glicosúria e a elevação de ureia e creatinina (RIVERS *et al.*, 1996; VEADO, 2003;  
13 WALDROP, 2008; TASSINI *et al.*, 2015).

14               A completa compreensão no mecanismo de ação dos diferentes  
15 biomarcadores de lesão renal frente à exposição a agentes tóxicos apresenta grande lacuna  
16 de conhecimento, fomentando pesquisas nesta área. Todavia alguns desafios devem ser  
17 enfrentados no desenvolvimento de pesquisas toxicológicas, como os desafios éticos na  
18 experimentação humana e animal (RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011; TASSINI *et*  
19 *al.*, 2015).

20               Como alternativa à avaliação *in vivo* em ensaios toxicológicos, as  
21 técnicas *ex vivo* como manutenção extracorpórea de órgãos e técnicas de explantes têm  
22 apresentado resultados promissores, em que suas limitações têm sido superadas pelos  
23 avanços científicos que hoje possibilitam o uso da técnica em diferentes tecidos, de forma  
24 a contribuir com diferentes ramos da ciência (BASSO; BRACARENSE, 2013).

25               Entre as vantagens da técnica de explante, destaca-se que a mesma  
26 permite a redução no número de animais utilizados em experimentação laboratorial, uma  
27 vez que são produzidos inúmeros explantes a partir de um único doador, conseguindo  
28 assim um maior controle ambiental para experimentação *in vitro*, quando comparado com  
29 o modelo *in vivo*. Outra possibilidade é a aplicação de doses definidas das substâncias de  
30 interesse diretamente no órgão alvo, comparando amostras tratadas e controles  
31 provenientes de um único doador, conseguindo assim produzir resultados mais fidedignos  
32 (KOLF-CLAUW *et al.*, 2009; RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011).

33               O modelo ainda possibilita a avaliação da morfologia dos órgãos  
34 analisados, bem como a dosagem de hormônios e a mensuração da produção de proteínas

1 (BASHA; BAZER; ROBERTS, 1979; KOLF-CLAUW *et al.*, 2009). Deve-se destacar  
2 que um dos grandes interesses no desenvolvimento do modelo é atender aos requisitos  
3 éticos e legais de forma a obter o máximo de informações utilizando-se o menor número  
4 de animais (BASSO; BRACARENSE, 2013). Portanto, o objetivo desse trabalho foi  
5 padronizar um modelo de explante renal, visando atender demandas éticas em estudos  
6 toxicológicos, conseguindo avaliar a morfologia renal, o estresse oxidativo e  
7 biomarcadores de lesão renal. Paralelamente, buscou-se compreender a capacidade de  
8 proteção renal do ácido fítico, em decorrência de seu potencial antioxidante.  
9

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### - CAPÍTULO 1 -

#### 2.1 ANATOMO-FISIOLOGIA RENAL

Os rins são conhecidos por sua função de excreção, por eliminar substâncias em excesso ou tóxicas ao organismo. Adicionalmente, este órgão é essencial à vida, por sua interação com o sistema endócrino, produzindo hormônios como eritropoetina, renina, prostaglandinas, cininas, e vitamina D na sua forma ativa ( $\alpha$ 1 hidroxilase), além de serem locais de ação dos hormônios como a vasopressina, paratormônio (PTH) e aldosterona, tendo relação direta com o controle da pressão arterial e eritropoiese (COWGILL, 1995; SKÁLOVÁ, 2005).

Outra função desempenhada pelos rins é a manutenção do equilíbrio hídrico e eletrolítico, por meio do adequado funcionamento dos néfrons em seus três processos fundamentais: filtração glomerular, reabsorção tubular e excreção tubular com conseqüente formação da urina (SKÁLOVÁ, 2005).

Tal processo de manutenção do equilíbrio de soluto e água no organismo de mamíferos tem expressiva importância, uma vez que o bom funcionamento renal está relacionado com a manutenção da homeostase do organismo. Assim, no homem, diariamente, 170 litros de água são filtrados e cerca de 99% desse volume é reabsorvido e 25 mol de sódio, 18 mol de cloreto e 5 mol de bicarbonato passam pela filtração glomerular, sendo posteriormente reabsorvidos ou excretados de forma a garantir um balanço entre as quantidades ingeridas e excretadas (ZATZ; SEGURO; MALNIC, 2011).

Em conjunto com os pulmões, que em seu processo de trocas gasosas promovem eliminação de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ), os rins também desempenham papel fundamental no controle do pH sanguíneo e na manutenção do equilíbrio ácido-base. Isso se deve, ao fato de o rim ser o único órgão capaz de se contrapor à sobrecarga de ácidos fixos por meio da produção de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) recompondo os estoques do tampão no organismo. Em contrapartida, quando a sobrecarga é alcalina, os rins reduzem a produção de  $\text{HCO}_3^-$  ou se necessário o excretam pela urina (ZATZ; SEGURO; MALNIC, 2011).

1           Entre os mamíferos, de forma generalizada, apesar de algumas  
2 características espécie-específicas, os rins seguem um padrão em sua anatomia e  
3 fisiologia. O rim apresenta uma região indentada chamada hilo por onde passam a artéria  
4 e veia renais, vasos linfáticos, suprimento nervoso e o ureter (GUYTON; HALL, 2011).

5           Histologicamente os rins podem ser divididos em duas regiões, sendo a  
6 camada mais interna chamada de medular, que se caracteriza por ser uma região que se  
7 projeta para a pelve renal, uma estrutura com formato de cálice que coleta e conduz a  
8 urina até o ureter. Na avaliação por microscopia óptica, a região cortical é formada em  
9 sua maior parte por túbulos contorcidos proximais, túbulos contorcidos distais e  
10 glomérulos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

### 11

#### 12 2.1.1 Unidade Funcional do Rim: O Néfron

### 13

14           O néfron é a unidade fundamental do rim, sendo formada em sua porção  
15 inicial por um grupo de capilares glomerulares chamado glomérulo. Este é responsável  
16 pelo processo de filtração em conjunto com um longo túbulo em que o ultrafiltrado passa  
17 pelo processo de reabsorção e excreção, sendo convertido em urina. O glomérulo, além  
18 da rede de capilares que se anastomosam, é formado por um folheto externo ou parietal  
19 que é constituído por um epitélio simples pavimentoso e um folheto interno ou visceral,  
20 formado por células modificadas chamadas de podócitos, formando assim a cápsula de  
21 Bowman (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; GUYTON; HALL, 2011).

22           O túbulo que constitui o néfron de acordo com a porção avaliada e a  
23 função desempenhada, recebe diferentes nomenclaturas. A partir do glomérulo tem-se o  
24 túbulo proximal que se situa na zona cortical renal, que é seguido pela alça de Henle que  
25 adentra a região medular renal e após a sua porção final, denominada mácula densa, que  
26 apresenta células epiteliais especializadas, novamente retorna a região cortical e  
27 denomina-se túbulo distal. Este é seguido pelo túbulo conector e o túbulo coletor cortical,  
28 que levam a urina ao ducto coletor cortical e ducto coletor medular que se esvaziam na  
29 pelve renal (GUYTON ; HALL, 2011).

### 30

## 31 2.2 NEFROPATIAS

### 32

33           A estreita relação anátomo-funcional entre as distintas partes do néfron  
34 faz com que a lesão glomerular e túbulo-intersticial, bem como vascular, ocorram de

1 forma concomitante ou progressiva. Em mamíferos, as principais glomerulopatias são  
2 inflamatórias, sendo consequência da deposição de imunocomplexos no interior dos  
3 capilares glomerulares (CORTADELLAS, 2011).

4           As nefropatias geralmente são decorrentes de processos secundários e  
5 a perda de proteína plasmática para urina é considerado o sinal da lesão tecidual mesmo  
6 que o quadro de insuficiência ainda não esteja estabelecido. Diagnosticar uma  
7 glomerulonefrite precocemente, por meio de marcadores de lesão renal, identificando a  
8 causa, de forma a instituir uma adequada terapêutica, pode evitar a morte do paciente por  
9 uma insuficiência renal aguda ou progressão da lesão para uma condição irreversível  
10 (CHEW *et al.*, 2011).

11           Em cães e gatos as principais causas de nefropatias secundárias são em  
12 decorrência a quadros infecciosos como leishmaniose, leptospirose, erliquiose e  
13 babesiose, quadros inflamatórios crônicos como piometra, dermatites, artrites,  
14 pancreatites e afecções vasculares, endócrinas, neoplásicas, bem como as intoxicações  
15 (ROSA *et al.*, 2014).

16           Com a perda de néfrons, áreas de cicatrizes e fibrose começam a se  
17 formar, alterando a hemodinâmica interna renal. Por mecanismos de compensação os  
18 néfrons remanescentes começam a se sobrecarregar e conseqüentemente ocorre um  
19 aumento da pressão glomerular, entrando em um processo de autocontrole deletério, pois  
20 a hipertensão desencadeia uma resposta inflamatória que culmina na degeneração e  
21 esclerose tecidual. A persistência destes fenômenos acarreta a instalação de um quadro  
22 renal degenerativo, progressivo e irreversível denominado doença renal crônica (DRC)  
23 (ROSA *et al.*, 2014).

### 24 25 2.2.1 Doença Renal Crônica

26  
27           A doença renal crônica (DRC) apresenta uma definição complexa em  
28 decorrência da correlação de diversos fatores estabelecidos. Entretanto, é uma afecção  
29 comumente visualizada em mamíferos, sendo definida como perda da função da unidade  
30 estrutural dos rins, os néfrons, provocando deste modo perda da capacidade de manter a  
31 homeostase, devido à redução da taxa de filtração glomerular, perda da capacidade de  
32 concentração da urina e diminuição da função endócrina (WAKI *et al.*, 2010)

1 A DRC pode ser classificada como primária, quando os néfrons  
2 degeneram devido à senilidade ou secundária a injúrias renais (WAKI *et al.*, 2010).  
3 Atualmente, a abordagem mais utilizada considera os estágios de progressão da doença,  
4 uma vez que as manifestações clínicas da DRC variam de intensidade conforme a  
5 evolução da lesão renal (ELLIOT; WATSON, 2009).

6 A *International Renal Interest Society* (IRIS) estabeleceu a  
7 classificação da DRC em cães, padronizando-a em quatro estádios: I (ausência de  
8 azotemia, valor de creatinina sérica menor que 1,4 mg/dL); II (azotemia leve, creatinina  
9 sérica entre 1,4 e 2,0 mg/dL); III (azotemia moderada, creatinina sérica entre 2,0 e 5,0  
10 mg/dL) e IV (azotemia grave, creatinina sérica superior a 5,0 mg/dL) (POLZIN, 2013).

11 Entre as potenciais causas de doença renal crônica deve-se considerar  
12 doenças imunológicas, amiloidose, neoplasias, agentes nefrotóxicos, isquemia renal,  
13 pielonefrite, doenças congênitas e hereditárias e quadros infecciosos, tendo destaque a  
14 leptospirose e a erliquiose (NELSON; COUTO, 2011).

15 Os agentes infecciosos e tóxicos geralmente promovem lesões  
16 isquêmicas afetando tanto o glomérulo quanto a porção tubular do néfron, e a sua detecção  
17 precoce facilita a apropriada intervenção para atenuar ou inibir o dano e o  
18 desenvolvimento de insuficiência renal (GRAUER, 2005).

19 Segundo Smet e colaboradores (2010), a doença renal crônica é uma  
20 causa importante de morbidade e mortalidade em cães, sendo que os principais sinais  
21 clínicos que os animais apresentam são poliúria, polidipsia, letargia, perda de peso, perda  
22 de apetite ou anorexia, vômito e diarreia.

23 A DRC apresenta correlação positiva com a idade, sendo diagnosticada  
24 em 15% dos cães com mais de 10 anos. O diagnóstico precoce pode possibilitar uma  
25 intervenção mais eficaz, permitindo um adequado manejo terapêutico, podendo assim  
26 reduzir o impacto do fator idade na progressiva diminuição da função renal (POLZIN *et*  
27 *al.*, 1989; SMET *et al.*, 2010).

28 No entanto, os testes de diagnóstico utilizados como rotina na avaliação  
29 renal, como ureia e creatinina sérica são avaliações específicas, mas tardias, apresentando  
30 alterações significativas de seus valores somente quando há uma perda de 75% da massa  
31 renal funcional (FINCO, 1995).

32 Uma expectativa tem sido criada em torno das enzimas urinárias quanto  
33 ao seu valor diagnóstico precoce, apesar de já demonstrado seu valor na detecção de danos  
34 tubulares agudos, seu correspondente no diagnóstico de doença renal crônica ainda

1 apresenta resultados controversos exigindo mais estudos (CLEMO, 1998). Segundo  
2 Heine *et al.* (1991) tanto a gama-glutamilttransferase (GGT) como a fosfatase alcalina  
3 (FA) urinária não apresentaram associação com a doença renal crônica evidenciando a  
4 necessidade de novos modelos experimentais para avaliar o papel diagnóstico das  
5 enzimas urinárias em quadros de nefrotoxicidade crônica.

6

### 7 2.2.2 Insuficiência Renal Aguda

8

9           Diversas desordens pré-renais, renais intrínsecas e pós-renais podem  
10 causar uma alteração aguda da função renal resultando em desequilíbrio hídrico,  
11 eletrolítico, ácido-base e inabilidade em excretar compostos nitrogenados resultantes dos  
12 processos metabólicos orgânicos (SINGRI *et al.*, 2003). Esta síndrome clínica  
13 considerada como insuficiência renal aguda (IRA) apresenta na medicina veterinária  
14 relatos de décadas, principalmente associado ao uso de aminoglicosídeos como a  
15 gentamicina (PANCOAST, 1988).

16

17           Na medicina humana, o termo insuficiência renal aguda, com os  
18 avanços das metodologias diagnósticas de lesão renal cada vez mais precoces, foi  
19 recentemente revisto, sendo renomeado como lesão renal aguda (LRA). A utilização do  
20 termo “lesão” ocorreu por este englobar todo os aspectos da IRA, reconhecendo que um  
21 rápido declínio da função renal é frequentemente secundário a uma lesão que já alterou

22

23           A primeira classificação em IRA baseava-se na avaliação de creatinina  
24 sérica, avaliando seu aumento em até sete dias sendo então classificada em cinco estágios,  
25 sendo eles: risco, lesão, falência, perda e estágio final da doença. Atualmente, com a  
26 classificação LRA, a medicina humana estabelece 3 estágios com a observação da  
27 elevação da creatinina sérica comparada ao valor basal ou aumento mínimo de 0,3 mg/dL  
em 48h, como representado na Tabela 1 (MEHTA *et al.*, 2007).

1 **Tabela 1.** Sistema de classificação para lesão renal aguda (LRA).

Estágio	Creatinina Sérica	Débito Urinário
1	Aumento $\geq 0,3$ mg/dL (26,4 $\mu$ mol) ou aumento $\geq 150 - 200\%$ do basal.	$< 0,5$ mL/Kg/h por mais de 6h
2	Aumento $>200 - 300\%$ do basal.	$< 0,5$ mL/Kg/h por mais de 12h
3	Aumento $>300\%$ do basal ou $\geq 4,0$ mg/dL com aumento agudo de no mínimo 0,5 mg/dL ou precisa de terapia de substituição renal	$< 0,3$ mL/Kg/h por 24h ou anúria por 12 horas ou precisa de terapia de substituição renal

2 **Fonte:** MEHTA *et al.* (2007) adaptado

3

4 A lesão renal aguda também pode ser classificada como pré-renal, renal  
 5 e pós renal. A lesão pré-renal geralmente é causada por alterações hemodinâmicas que  
 6 caso não sejam solucionadas podem lesionar o rim, levando assim a um quadro renal de  
 7 necrose tubular aguda (NTA), que pode ser decorrente de hipoperfusão renal, hipóxia e  
 8 toxicidade. Outro mecanismo é o pós-renal, causado por obstrução mecânica das vias  
 9 urinárias, que se não for revertida pode evoluir para perda da função renal permanente  
 10 (DEVARAJAN, 2006).

11 Entre os quadros de lesão aguda pré-renal, a isquemia está presente na  
 12 maioria dos casos. Este processo precocemente resulta na redução dos níveis  
 13 intracelulares de ATP, afetando as porções do néfron que possuem alta taxa de reabsorção  
 14 tubular com gasto de energia, como o túbulo contorcido proximal e a alça de Henle, que  
 15 são particularmente mais susceptíveis à isquemia por apresentarem elevado consumo de  
 16 ATP. Essa redução intracelular de ATP, por sua vez, desencadeia uma série de eventos  
 17 que levam à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que são altamente tóxicos  
 18 ou lesivos para as células (ANDRADE *et al.*, 2004).

19 Essas EROS promovem a desestruturação do esqueleto celular,  
 20 desarranjo da membrana com disfuncionalidade das bombas e ativação de enzimas  
 21 oxidantes, além de alterações mitocondriais que limitam ainda mais a oferta de ATP para  
 22 a célula. Tais alterações levam a lesões que são histologicamente caracterizadas pela  
 23 perda da borda em escova dos túbulos proximais, desprendimento de células tubulares,  
 24 debris celulares e áreas de regeneração celular (ANDRADE *et al.*, 2004; KARAMAN *et*

1 *al.*, 2006).

2                   Nos quadros isquêmicos agudos, a necrose não é extensa, restringindo-  
3 se a regiões altamente sensíveis na parte mais externa da região medular, além disso é  
4 comumente observado congestão peritubular com danos endoteliais e acúmulo de  
5 leucócitos (DEVARAJAN, 2006; KARAMAN *et al.*, 2006).

6                   Devarajan (2006) demonstrou que após lesão renal aguda isquêmica as  
7 células epiteliais tubulares podem apresentar as seguintes evoluções: permanecer viáveis,  
8 indicando que não foram lesadas, ou morrer, pelos mecanismos distintos de apoptose ou  
9 necrose. A necrose é caracterizada pela perda da integridade da membrana celular, edema  
10 citoplasmático e fragmentação celular. Já a apoptose é caracterizada por condensação  
11 citoplasmática e nuclear, fragmentação do DNA e separação dos corpos apoptóticos que  
12 geralmente são encontrados após lesões mais brandas, sendo mais comumente visualizada  
13 nos segmentos distais dos néfrons (DEVARAJAN, 2006).

14                   Os sinais clínicos mais comumente apresentados nos quadros de IRA  
15 em mamíferos são a presença de oligúria ou anúria, letargia, fraqueza muscular, anorexia,  
16 náuseas e vômito, sendo que alguns casos mais graves podem apresentar edemas e  
17 anemia. Estes geralmente são inespecíficos, dificultando a identificação precoce da  
18 doença (RIELLA, 1996; SMELTZER *et al.*, 2010).

19                   O teste padrão ouro para o diagnóstico de IRA é a dosagem sérica de  
20 creatinina, entretanto apresenta limitações, podendo ser considerado um teste pouco  
21 sensível e tardio, sofrendo interferência de fatores como a idade, gênero, massa muscular,  
22 metabolismo e hidratação do indivíduo (SHEMESH *et al.*, 1985).

23                   Portanto, novos marcadores de lesão tubular têm se mostrado como  
24 alternativa no preenchimento dessas limitações. Entretanto, para avanços nos estudos de  
25 marcadores de lesão renal, principalmente relacionados à toxicidade, o desenvolvimento  
26 de novas técnicas de pesquisa são essenciais, de forma a possibilitar o melhor  
27 entendimento desses marcadores de função renal (HOFMANN; GUDER 1989).

28

### 29 2.3 MARCADORES DE LESÃO RENAL

30

31                   A ureia e a creatinina, indicadores bioquímicos de lesão renal  
32 amplamente utilizados, em quadros de lesão renal aguda, em avaliações isoladas,  
33 demonstram baixa sensibilidade e resposta tardia para o diagnóstico, sendo sua avaliação

1 seriada e comparada mais efetiva na avaliação da função renal em processos agudos  
2 (FINCO *et al.*, 1995; DiBARTOLA, 2000; KERR, 2003).

3           Entre as avaliações laboratoriais clássicas da função renal, a presença  
4 de cilindros celulares na urina, a densidade urinária e proteinúria podem ser utilizados  
5 para caracterizar o processo de necrose tubular aguda. No entanto, assim como a ureia e  
6 a creatinina sérica, essas avaliações não possibilitam detectar alterações tubulares com  
7 antecedência suficiente para prevenir o desenvolvimento de necrose tubular ou que  
8 possibilite intervenções reversíveis do quadro (CLEMO, 1998).

9           Assim, cada vez mais estudos têm buscado biomarcadores de lesão  
10 renal que sejam mais específicos e sensíveis, de forma a determinar precocemente lesões  
11 renais. Na medicina humana, a utilização destes marcadores está consolidada ou com  
12 estudos avançados, enquanto que na medicina veterinária os dados são escassos  
13 (FREITAS *et al.*, 2014).

14           Deste modo, para uma melhor compreensão da utilidade dos  
15 biomarcadores renais urinários como diagnóstico precoce de enfermidades, é útil  
16 descrever primeiramente a fisiologia da excreção urinária destes marcadores. Entre as  
17 proteínas com capacidade de marcador de lesão um maior destaque é dado às enzimas,  
18 pois em condições fisiológicas as enzimas encontradas na urina podem ter origem no  
19 plasma, como filtrado glomerular, de células tubulares renais e do trato urogenital  
20 (CLEMO, 1998).

21           Excluindo-se afecções glomerulares, a atividade de enzimas séricas na  
22 urina é insignificante, pois a maioria destas enzimas apresenta tamanho molecular grande,  
23 geralmente superior 80.000 Daltons, sendo incapazes de ultrapassar o glomérulo íntegro.  
24 As células epiteliais do trato urogenital também são fontes pobres em enzimas urinárias,  
25 porque o conteúdo enzimático destas células é baixo. Entretanto, principalmente nos  
26 machos, as secreções glandulares como das glândulas vesiculares, próstata, glândulas de  
27 Cowper e glândulas de Littre, podem ter contribuições importantes na atividade  
28 enzimática urinária, visto que já foi demonstrado que o sémen de cães é uma importante  
29 fonte de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) (RAAB, 1972; HIGASHIYAMA *et al.*,  
30 1983; NAKAMURA *et al.*, 1983).

31           Deste modo, atualmente destacam-se como os principais  
32 biomarcadores de lesão renal as proteínas urinárias gama-glutamyltransferase (GGT), N-  
33 Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG), cistatina C, interleucina 18 (IL-18), glicoproteína  
34 transmembrana do tipo 1 (KIM 1), lipocaína associada à gelatinase neutrofílica (NGAL),

1 fosfatase alcalina (FA), lactato desidrogenase (LDH) e a fração hepática das proteínas  
2 ligadas a ácidos graxos (L-FABP) (FREITAS *et al.*, 2014; SODRÉ *et al.*, 2007;  
3 GALVÃO *et al.*, 2010).

4 Além das proteínas de baixo peso molecular (PMB), as enzimas  
5 também são importantes substâncias na avaliação da função tubular. A NAG localiza-se  
6 primariamente nas células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais e quando há maior  
7 excreção de proteínas nos túbulos renais, há aumento da atividade lisossomal e  
8 consequente excreção da NAG (WALDROP, 2008).

9 A GGT se localiza na borda em escova dos túbulos proximais e é muito  
10 grande para ser filtrada normalmente pelos glomérulos. Quando presente na urina indica  
11 alteração, usualmente associada à lesão epitelial tubular ou necrose (RIVERS *et al.* 1996;  
12 WALDROP, 2008).

13 Outras enzimas como leucina aminopeptidase (LAP), fosfatase ácida  
14 (FAC), alanina aminopeptidase (AAP), a  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -glu), a  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -  
15 GAL), e lisozima (muramidase), também foram avaliadas em cães (CLEMO, 1998;  
16 PRESSLER, 2013).

17 As proteínas urinárias, algumas com função enzimática, podem ser  
18 utilizadas para auxiliar na localização da lesão renal devido às diferentes porções do  
19 néfron conterem enzimas características. Estas também podem ser usadas para avaliar o  
20 grau de lesão renal através do aumento da sua excreção (CLEMO, 1998).

21 Sua classificação de acordo com o peso molecular apresenta extrema  
22 importância, pois pode indicar o tipo de lesão e sua gravidade. Estas são categorizadas  
23 em proteínas com peso molecular elevado (PME), peso molecular intermediário (PMI) e  
24 de baixo peso molecular (PMB) (FINCO, 2005; D'AMICO, 2003). Assim, sabe-se que  
25 disfunções glomerulares levam a uma maior filtração de proteínas com peso molecular  
26 intermediário como a albumina e mediante a evolução do quadro e a perda da função  
27 renal, proteínas de alto peso molecular podem ser encontradas no ultrafiltrado  
28 (D'AMICO, 2003).

29 Apesar desta condição, o uso de proteínas urinárias com função  
30 enzimática para monitorar lesão glomerular apresenta um valor limitado de interpretação,  
31 pois, somente indicam alterações na filtração glomerular, que ocorrem em estágios  
32 avançados de injúria renal. Este é o principal fator limitante da interpretação da lesão  
33 glomerular baseado em enzimas urinárias (CLEMO, 1998).

1 Na medicina veterinária, as enzimas urinárias têm sido primariamente  
2 utilizadas na avaliação de nefrotoxicidade tubular aguda por serem testes sensíveis e não  
3 invasivos de lesão tubular renal. O aumento na atividade de enzimas urinárias foi  
4 observado em nefropatias induzidas pela gentamicina, mesmo quando os testes de função  
5 renal são normais, o que sugere que as enzimas urinárias podem ser úteis na detecção de  
6 lesões renais mais precoces (UECHI *et al.*, 1994; ROCHA; VEADO, 2005).

7 Segundo Hoffmann *et al.* (2010), a nefrotoxicidade aguda induzida por  
8 tratamento a curto prazo com gentamicina é evidenciada com o aumento da excreção  
9 urinária de cistatina C e NGAL, que ocorre no primeiro dia da administração da droga  
10 mesmo em baixas doses. Nesse estudo também verificou-se uma relação dose e tempo  
11 dependente no aumento das concentrações de NGAL urinária, cistatina C, calbindina,  
12 glicoproteína transmembrana do tipo 1 renal (KIM-1) e clusterina, sendo todos mais  
13 precoces do que alterações da creatinina e ureia séricas.

14 Atualmente, não há consenso sobre quais enzimas são as melhores no  
15 processo de diagnóstico precoce de lesão renal, mas duas das enzimas têm sido mais  
16 utilizadas ou citadas nos estudos, a NAG e a GGT, apresentam características como  
17 estabilidade térmica (4°C a 40°C) e a possibilidade de serem quantificadas na urina sem  
18 necessidade de tratamento prévio, como a remoção de inibidores enzimáticos (GOSSETT  
19 *et al.*, 1987; REUSCH *et al.*, 1991; MATTEUCCI; GIAMPIETRO, 1993).

20 Pesquisas têm evidenciado o papel da microalbuminúria como  
21 importante teste precoce de avaliação renal; neste teste detectam-se concentrações de  
22 albumina não avaliadas em análises convencionais como o teste de fitas reativas. A  
23 microalbuminúria pode ser um indicador de lesão glomerular em cães assim como  
24 proteínas de alto peso molecular como a proteína C reativa (PCR) (SMET *et al.*, 2010).

25 A PCR é uma proteína de fase aguda que possui suas concentrações  
26 séricas elevadas em processos inflamatórios, sendo sua relação com processos renais e  
27 sua avaliação urinária pouco abordada (SMET *et al.*, 2010). Segundo Nakamura *et al.*  
28 (2008) em cães com piometra o aumento da concentração da PCR está diretamente  
29 relacionado com o aumento das concentrações de creatinina. Entretanto, um estudo que  
30 comparou os níveis de PCR urinário de cães saudáveis e com doença renal, não  
31 evidenciou diferenças significativas nas concentrações urinária entre os grupos, mas  
32 demonstrou que nos animais saudáveis a PCR encontrava-se ausente na urina e em três  
33 animais doentes esta foi mensurada, levantando hipóteses do envolvimento inflamatório  
34 com a piora do quadro clínico e lesão glomerular avançada (SMET *et al.*, 2010).

1 Já a avaliação da disfunção tubular é feita por mensuração de proteínas  
2 de baixo peso molecular que apresentam reabsorção tubular. Entre estas proteínas temos  
3 o retinol, associada a perda da função tubular proximal em humanos, em cães com doença  
4 renal e em gatos com hipertireoidismo (TOPPING *et al.*, 1986; RAILA *et al.*, 2003a).

5 O retinol, na maioria dos mamíferos, circula associado a uma proteína,  
6 a transtirretina e liga-se à vitamina A impedindo a sua filtração glomerular e excreção.  
7 Entretanto, em cães existem altas concentrações do complexo retinol-transtirretina, de  
8 forma que este é filtrado pelo glomérulo e em condições fisiológicas em quase sua  
9 totalidade reabsorvido pelos túbulos contorcidos proximais (RAILA *et al.*, 2003b).

10 Diversos estudos têm evidenciado a importância do retinol como  
11 marcador de função tubular em cães. Já foram evidenciados maiores concentrações dessa  
12 proteína na urina de cães com doença renal em comparação com cães saudáveis, além de  
13 alta correlação com as concentrações séricas de creatinina, ureia, razão proteína e  
14 creatinina urinária (UPC), e os estágios de classificação da IRIS (RAILA *et al.*, 2003a;  
15 FORTERRE *et al.*, 2004; SMET *et al.*, 2010).

16 Apesar de entendimentos específicos atribuídos a diferentes  
17 marcadores urinários, a maioria dos estudos em cães se concentraram em avaliar um  
18 marcador urinário, ao passo que a avaliação combinada de diferentes marcadores que  
19 possibilitem estimar de forma completa o impacto da doença renal no néfron como um  
20 todo, ainda é escassa (SMET *et al.*, 2010).

21 Nesse sentido, estudos começam a avaliar a função renal utilizando  
22 painéis de marcadores de lesão comparando as respostas entre os diferentes marcadores.  
23 Deste modo, um estudo que comparou a resposta de 10 marcadores frente a nefrotoxicidade  
24 induzida por gentamicina demonstrou que a cistatina C, calbindina e NGAL foram os  
25 indicadores mais sensíveis. Entretanto, quando o agente nefrotóxico foi a micotoxina  
26 ocratoxina A (OTA), o marcador KIM-1 urinário superou todos os demais marcadores  
27 em indicar lesão renal subcrônica (HOFFMANN *et al.*, 2010).

28 Independentemente da sensibilidade do teste e da sua especificidade,  
29 respostas individuais aos biomarcadores podem ocorrer, não dependendo apenas da  
30 extensão e local da lesão, mas do composto específico sob investigação e o agente  
31 nefrotóxico ou mecanismo de nefrotoxicidade. Portanto, análises por meio de painéis de  
32 marcadores renais demonstram ser a melhor alternativa na avaliação de lesão renal aguda  
33 e crônica (HOFFMANN *et al.*, 2010).

1 Outra aplicação destes marcadores de lesão quando analisados em  
2 conjunto é a determinação da extensão do dano renal, principalmente através do aumento  
3 da atividade enzimática urinária, visto que estas são sensíveis a discretas agressões  
4 teciduais. No entanto, apesar do potencial destas avaliações, as interpretações devem ser  
5 pensadas com cautela, pois uma variação fisiológica significativa tem sido relatada para  
6 algumas enzimas como GGT, NAG e alanina aminopeptidase em cães saudáveis  
7 (GRECO *et al.*, 1985; GOSSETT *et al.*, 1987; REUSCH *et al.*, 1991; GRAUER *et al.*,  
8 1995). Assim, conhecer todos os fatores que podem contribuir para a variação biológica  
9 da atividade enzimática urinária é necessário, e para isso estudos *in vivo*, *in vitro* e *ex-*  
10 *vivo* são importantes para elucidação concernente a esta temática ainda existente  
11 (CLEMO, 1998).

### 12 13 2.3.1 N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG)

14  
15 A NAG é uma glicosidase lisossomal presente nas células tubulares  
16 proximais que apresenta um peso molecular relativamente elevado, de 130.000 a 140.000  
17 Daltons, não permitindo assim a sua filtração glomerular. Portanto, sua excreção urinária  
18 é representada pelas isoenzimas presentes nos túbulos contorcidos proximais. As duas  
19 principais isoenzimas de NAG estão presentes nos rins e no fígado, sendo  
20 respectivamente a isoforma ácida A e a isoforma básica B, sendo ambas estáveis contra  
21 alterações no pH e da temperatura (TUCKEY *et al.*, 1980; PRICE *et al.*, 1992).

22 Segundo Smet *et al.* (2010), a enzimúria pode ser um indicador de  
23 doença ativa em cães, demonstrando a persistência de danos as células renais. Entretanto,  
24 com o desaparecimento da causa primária ou do dano tecidual, a enzimúria pode se tornar  
25 mínima, mesmo que os danos teciduais tenham sido amplos e que ainda continue a ocorrer  
26 a perda de células tubulares.

27 A avaliação, tanto da concentração quanto da atividade da NAG na  
28 urina, provou ser um instrumento útil para detecção precoce de lesão renal em decorrência  
29 a diferentes causas em seres humanos, tais como diabetes mellitus, síndrome nefrótica,  
30 inflamação e infecção do trato urinário, hipercalciúria, litíase urinária, nefrocalcinose,  
31 asfixia perinatal, intoxicação por metais traço, nefrotoxicidade pelo uso de  
32 aminoglicosídeos, valproato e outras drogas nefrotóxicas, hipóxia e hipertensão arterial  
33 (SKALOVA, 2005).

1 Na medicina veterinária a associação entre o aumento da atividade de  
2 NAG na urina e a relação NAG/Creatinina foi estabelecida em cães com doença renal  
3 crônica (UECH *et al.*, 1994; SATO *et al.*, 2002), leshimaniose (PALACIO *et al.*, 1997),  
4 piometra (HEIENE *et al.*, 2001; SATO *et al.*, 2002) e ação nefrotóxica por  
5 aminoglicosídeos, anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e glicocorticoides  
6 (GRAUER *et al.*, 1995; NARITA *et al.*, 2007).

7 Apesar de estudos com cães submetidos à nefrotoxicidade induzida por  
8 drogas demonstrarem que a NAG apresenta uma resposta mais precoce que outros  
9 marcadores de lesão renal como a fosfatase alcalina, fosfatase ácida,  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -  
10 GLU),  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL), a atividade desta enzima apresenta algumas limitações  
11 a serem levadas em consideração em sua interpretação, como por exemplo os machos  
12 apresentarem aproximadamente duas vezes a concentração urinária de NAG quando  
13 comparado com fêmeas (ELLIS *et al.*, 1973; HIGASHIYAMA, *et al.*, 1983;  
14 NAKAMURA *et al.*, 1983).

### 16 2.3.2 Gama-Glutamiltransferase (GGT)

17  
18 A gama-glutamiltransferase (GGT) é uma enzima com função de  
19 transporte de aminoácidos, participando consequentemente na manutenção da reserva de  
20 aminoácidos celulares. Tem sua concentração máxima nos bordos em escova dos túbulos  
21 renais proximais e alça de Henle. Entretanto, outros órgãos como fígado, pâncreas, baço,  
22 pulmão, intestino delgado, placenta, sistema nervoso central, próstata e miocárdio  
23 também expressam essa enzima em menores concentrações (HENNEMANN *et al.*,  
24 1997).

25 A GGT urinária em cães é considerada um marcador precoce e  
26 persistente de lesão renal, uma vez que estudos demonstram que sua atividade urinária  
27 antecede o aparecimento de proteinúria, glicosúria e a elevação sérica de ureia e creatinina  
28 em cães com nefrotoxicidade induzida por gentamicina (RIVERS *et al.*, 1996;  
29 HENNEMANN *et al.*, 1997; VEADO, 2003).

30 Segundo Melchert e colaboradores (2007), a GGT urinária demonstrou  
31 ser eficaz e efetiva na avaliação precoce de lesão renal induzida por gentamicina em  
32 comparação aos métodos tradicionais, uma vez que suas concentrações se elevaram acima  
33 dos valores de referência dois dias após o início da administração do aminoglicosídeo,

1 enquanto que os níveis séricos de creatinina e ureia tiveram seus valores elevados somente  
2 após o sétimo dia de administração do medicamento.

3 Além de sua utilidade quanto à avaliação do processo nefrotóxico por  
4 gentamicina, a atividade enzimática urinária da gama-glutamilttransferase tem sido  
5 utilizada para avaliar a função renal em quadros de piometra (HEIENE *et al.*, 2001),  
6 dirofilariose (UECHI *et al.*, 1994) e leishmaniose (PALACIO *et al.*, 1997).

7 Apesar de sua aplicabilidade, a avaliação da atividade de GGT urinária  
8 tem se demonstrado controversa em pesquisas que visam utilizá-la como indicador de  
9 disfunção renal em terapias com fármacos nefrotóxicos. Silva Melo *et al.* (2006), ao  
10 comparar a taxa de filtração glomerular (TFG) e a atividade de enzimas urinárias como a  
11 GGT em ratos intoxicados por paracetamol, observou alterações dos níveis de atividade  
12 de GGT 24 horas após a administração do anti-inflamatório, concluindo ser um teste de  
13 baixo custo, sensível e precoce para avaliar lesão renal aguda. Entretanto, Santin *et al.*  
14 (2006), ao pesquisarem a atividade da GGT urinária em cães sadios submetidos à terapia  
15 com anfotericina-B, produto este com conhecida ação tóxica tubular proximal e distal,  
16 não observaram diferença entre o tempo de alteração dos níveis séricos de creatinina e  
17 ureia em relação a GGT, relatando não haver diferença na precocidade diagnóstica entre  
18 a GGT e a creatinina.

### 20 2.3.3 Cistatina C

21  
22 A cistatina C é uma proteína inibidora da proteinase da cisteína, sendo  
23 uma molécula de baixo peso com aproximadamente 15 kDa, não é glicosilada, tem reação  
24 catalisada em meio alcalino, é sintetizada por um gene expresso em todas as células  
25 nucleadas, tendo sua produção constante. Todas essas características propiciam a sua  
26 utilização como marcador da função renal, já que ela é livremente filtrada pelos  
27 glomérulos, sendo posteriormente em sua totalidade reabsorvida e metabolizada pelo  
28 epitélio tubular, não sendo excretada na urina nem retornando à corrente circulatória  
29 (COCKCROFT, GAULT, 1976; HOFFMANN *et al.*, 2010).

30 A dosagem de cistatina C sérica tem grande importância na avaliação  
31 da taxa de filtração glomerular, principalmente quando se faz uma análise pareada com a  
32 creatinina de pacientes com doença renal (HOFFMANN *et al.*, 2010). Entretanto, sua  
33 aferição urinária ainda é controversa, havendo pouca evidência clínica ou experimental  
34 que alterações em suas concentrações urinárias são sensíveis em resposta a toxicidade

1 tubular (COLLE *et al.*, 1990; CONTI *et al.*, 2006; LIANGOS *et al.*, 2009; UCHIDA e  
2 GOTOH, 2002).

3                 Sendo assim, esse marcador endógeno tem demonstrado ser promissor  
4 na medicina veterinária por possibilitar estimar a taxa de filtração glomerular (TFG), sem  
5 a necessidade da determinação do clearance de creatinina, dispensando a coleta de urina  
6 por 24 horas e solucionando um dos principais problemas dos outros marcadores  
7 endógenos para avaliar a TFG. Outra vantagem da cistatina C é que sua dosagem não  
8 sofre alterações no caso de doenças não renais como neoplasias e infecções. A  
9 metodologia mais utilizada atualmente é o imunoenensaio homogêneo automatizado,  
10 utilizando partículas de látex ou poliestireno ligadas a anticorpos monoclonais específicos  
11 contra a cistatina C (COLL, *et al.*, 2000; WEHNER e HARTMANN, 2008).

12

#### 13 2.3.4 Lipocaína Associada à Gelatinase Neutrofílica (NGAL)

14

15                 A NGAL é uma proteína da classe das lipocaínas que tem como função  
16 o transporte de pequenas moléculas hidrofóbicas como esteroides ou lipídios e sequestra  
17 ferro via sideróforos impedindo a ligação deste com espécies reativas de oxigênio que são  
18 prejudiciais as células (KJELDSENS *et al.*, 1993; MORI *et al.*, 2005).

19                 A NGAL mensurada tanto na urina, quanto no soro atua como  
20 importante marcador de lesão de túbulos proximais (SCHMIDT-OTT *et al.*, 2007;  
21 NGUYEN; DEVARAJAN, 2008). Segundo Mishra *et al.* (2006) os níveis de NGAL já  
22 aparecem aumentados de duas a seis horas após o desenvolvimento de uma lesão renal  
23 aguda, tanto na urina quanto no soro.

24                 No entanto, apesar de sua aplicabilidade clínica, é considerado um  
25 biomarcador pouco específico, pois esta proteína é expressa por neutrófilos e várias  
26 células epiteliais; além de apresentar aumento de expressão pelo túbulo distal durante a  
27 IRA (NICKOLAS *et al.*, 2008). Estudos da avaliação de NGAL utilizando o suíno como  
28 modelo tem demonstrado aumento da concentração urinária desta proteína,  
29 principalmente após eventos isquêmicos (JOCHMANS *et al.*, 2011; HUNTER *et al.*,  
30 2012; SILBERSTEIN *et al.*, 2013; MATEJKOVÁ *et al.*, 2013).

### 2.3.5 Glicoproteína Transmembrana do Tipo 1 Renal (KIM-1)

A KIM-1 é um receptor de fosfatidilserina responsável pela depuração dos detritos apoptóticos do lúmen tubular renal. Essa proteína direciona os restos celulares para lisossomos, evitando a ativação da resposta imune. Além disso, esta molécula tem papel de limpeza tecidual, estando relacionada com a fagocitose de lipoproteínas oxidadas e células necróticas pelas células proximais (ICHIMURA, 1998). Portanto, a KIM-1 tem sido relatada como marcadora de lesão tubular, pois tem seus níveis urinários rapidamente aumentados após o início da lesão (VAIDYA *et al.*, 2008).

Esta glicoproteína possui um domínio de imunoglobulina e mucina, que não são detectados em tecido renal normal ou urina de indivíduos saudáveis. Entretanto, é expressa em níveis muito elevados em células do epitélio tubular proximal renal em rins de humanos e de roedores após lesão isquêmica ou tóxica (PERES *et al.*, 2013).

O aumento de KIM-1 tem utilidade como biomarcador no diagnóstico precoce de lesão renal, mesmo não se tratando de um marcador específico tubular, pois está relacionado com um amplo número de doenças renais como glomerulonefrites, nefropatias, rejeição aguda, hipertensão, entre outras (TIMMEREN *et al.* 2007).

### 2.3.6 Interleucina 18 (IL-18)

Essa citocina pró-inflamatória sintetizada por macrófagos, monócitos e células epiteliais dos túbulos distais renais e ducto coletor, tem despertado atenção quanto à sua utilidade como marcador de lesão renal, já sendo demonstrado que pacientes transplantados que apresentam rejeição têm os níveis de IL-18 no córtex renal e no soro superiores a outros indivíduos sem tais complicações (STRIZ *et al.*, 2005; SIMSEK *et al.*, 2013). A IL-18 urinária também tem sido utilizada como fator preditor de lesão renal aguda em pacientes após 4 horas de cirurgia cardíaca e seus valores têm apresentado correlação com o tempo de internação e o estado de saúde do paciente (PARIKH *et al.*, 2006; PARIKH *et al.*, 2011).

A IL-18 é constitutivamente expressa nas células do túbulo contorcido distal e do túbulo coletor renal. Essa interleucina apresenta-se em sua forma inativa (pró-IL18) no meio intracelular, e para sua ativação precisa se associar ao componente P2X7 e a cisteína protease intracelular caspase-1, a qual converte a pró-forma da IL-18 na sua

1 forma ativa, que, em seguida, é liberada da célula tubular para o lúmen aumentando seus  
2 níveis urinários (PERES *et al.*, 2013).

#### 4 2.4 ESTRESSE OXIDATIVO NA LESÃO RENAL

6 As espécies reativas de oxigênio (EROS) são moléculas formadas a  
7 partir de um processo fisiológico contínuo de metabolismo de oxigênio, apresentando em  
8 sua estrutura um elétron livre, o que as tornam altamente instáveis e reativas  
9 (GUTOWSKI; KOWALCZYK, 2013).

10 As EROS são formadas a partir de processos que levam à redução  
11 incompleta do O<sub>2</sub>, como na respiração mitocondrial, inflamação e biotransformação  
12 metabólica mediada por fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH)  
13 oxidases (LOFT *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2010). Nas mitocôndrias, por meio da  
14 cadeia transportadora de elétrons, durante a produção de energia a partir da glicose e do  
15 oxigênio, ocorre a formação de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
16 e radicais hidroxila (OH), todos classificados como EROS (VINA *et al.*, 2013).

17 A produção contínua de radicais livres durante os processos  
18 metabólicos ou patológicos, quando em desequilíbrio com os sistemas antioxidantes  
19 endógenos, com concomitante aumento de substâncias oxidantes que provoquem ou  
20 ampliem danos ao organismo é conhecido como estresse oxidativo  
21 (KALYANARAMAN, 2013).

22 O sistema antioxidante endógeno possui uma atuação enzimática,  
23 responsável pela detoxificação do agente oxidante por meio das enzimas como catalase,  
24 superóxido dismutase e peroxidases antes que ele promova a lesão. Aditivamente um  
25 sistema não enzimático que se divide em antioxidantes hidrofílicos (glutathiona, vitamina  
26 C, indóis e catecóis) e os antioxidantes lipofílicos (vitaminas A e E e as bioflavonas) tem  
27 a função de reparar a lesão já ocorrida (VINA *et al.*, 2013).

28 Vários órgãos com alta taxa metabólica como os rins, fígado, pulmão,  
29 cérebro e coração podem sofrer lesão quando esses mecanismos de proteção e reparo se  
30 tornam deficientes. Há várias afecções que induzem o estresse oxidativo nos rins, dentre  
31 elas a hipertensão, diabetes mellitus, síndrome metabólica, hiperlipidemia, infecções, uso  
32 de alguns antibióticos, toxinas e radiação (OZBEK, 2012).

1           Estudo que avaliou o estresse oxidativo renal frente a exposição à  
2 gentamicina observou, além do dano oxidativo através de uma elevação de 89% na  
3 expressão de compostos carbonílicos no grupo que recebeu o aminoglicosídeo em relação  
4 ao grupo controle, uma redução significativa na capacidade antioxidante da amostra com  
5 redução de 16% da atividade da superóxido dismutase (SOD), 39% da glutathione redutase  
6 e 52% da catalase (MALDONADO *et al.*, 2003).

7           O impacto sobre o estado oxidativo do tecido renal foi avaliado em  
8 estudo *in vivo* comparando ratos com dieta contaminada com micotoxina (AF 597 mg/kg,  
9 ZEN 729 mg/kg, DON 3.1 mg/kg) e grupo controle com dieta livre de micotoxina, visto  
10 que o rim é o principal órgão de excreção dos metabólitos de micotoxinas. Apesar de os  
11 níveis de malondialdeído (MDA) não apresentarem diferenças significativas entre os  
12 grupos, observou uma redução da capacidade antioxidante da amostra por menor  
13 atividade das catalases (CAT) (HOU *et al.*, 2013).

14           As espécies reativas de oxigênio têm sido apontadas como agente  
15 causador de morte celular renal em muitos quadros patológicos, como em doenças  
16 glomerulares, lesão isquêmica e de reperfusão renal e em vários modelos de insuficiência  
17 tóxica (SHAH *et al.*, 1987; GRUNE *et al.*, 1995; BALIGA *et al.*, 1999).

18           Todos os componentes celulares são suscetíveis aos processos de  
19 oxidação, porém a membrana celular é um dos mais atingidos. Há grande quantidade de  
20 fosfolípidios presente nas membranas celulares, tornando-as alvo fácil e rapidamente  
21 afetado quando as espécies reativas de oxigênio são formadas. Estes radicais reagem com  
22 ácidos graxos poliinsaturados para formar lipoperóxidos que compõem a cascata de  
23 reações degenerativas dos lipídeos, processo denominado de peroxidação lipídica  
24 (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2007).

25           A peroxidação lipídica é considerada como o principal mecanismo  
26 molecular envolvido no dano oxidativo às estruturas celulares e no processo de toxicidade  
27 que leva à morte celular (DIANZANI; BARRERA, 2008). Para a mensuração da  
28 lipoperoxidação de membranas, a determinação das substâncias reativas ao ácido  
29 tiobarbitúrico (TBARS) capaz de mensurar indiretamente os níveis MDA é um teste  
30 frequentemente utilizado, mostrando grande utilidade (SCHUSTER *et al.*, 1987).

31           Outra abordagem utilizada para avaliar o papel do estresse oxidativo,  
32 principalmente em eventos agudos, tem sido a análise do consumo de moléculas  
33 componentes do sistema antioxidante como SOD, CAT, glutathione peroxidase (GSPx),  
34 carotenoides, ácido ascórbico e glutathione reduzida (GSH) (KATALINIC *et al.*, 2005).

1                   Alguns testes de capacidade antioxidante, apesar de inespecíficos, têm  
2 sido eficazes em demonstrar redução da resposta endógena frente a uma agressão tecidual  
3 com formação de espécies reativas de oxigênio. Entre estes, são mais difundidos o ensaio  
4 do poder de redução do ferro (FRAP) e poder de redução do 2,2-azinobis (3-  
5 etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (KATALINIC *et al.*, 2005).

## 6 7 2.5 O ÁCIDO FÍTICO COM SUBSTÂNCIA ANTIOXIDANTE

8  
9                   O ácido fítico é denominado mioinositol hexafosfato ou IP6, sua forma  
10 de sal livre é o fitato e o sal de cálcio e magnésio é denominado fitina (PLAAMI, 1997).  
11 É encontrado na maioria dos cereais, sementes oleaginosas e legumes, constituindo cerca  
12 de 1 a 5% do peso e 60 a 90% de fósforo total (EATON, 1990). Em muitas espécies de  
13 plantas, 90% do ácido fítico encontra-se na aleurona, uma pequena estrutura que separa  
14 o endosperma da casca, e 10% localiza-se no embrião. Fatores como genética, variações  
15 ambientais, local, condições de irrigação, tipos de solo e aplicações de fertilizantes afetam  
16 a biodisponibilidade de ácido fítico e fósforo nos grãos (DOST; TOKUL, 2006).

17                   Pela ação de fitases endógenas durante a estocagem, fermentação,  
18 germinação, processamento e digestão dos grãos e sementes, o ácido fítico pode ser  
19 parcialmente desfosforilado produzindo compostos pentafosfato (IP<sup>5</sup>), tetrafosfato (IP<sup>4</sup>) e  
20 trifosfato (IP<sup>3</sup>). Porém, estudos *in vitro* indicam que somente IP<sup>5</sup> e IP<sup>6</sup> tem alta capacidade  
21 de se ligar em minerais, promovendo uma redução na sua biodisponibilidade  
22 (SANDBERG; CARLSSON; SVANBERG, 1989). Cerca de 90% do inositol encontrado  
23 nos grãos está na forma hexafosfórica, e os 10% restantes representam a somatória dos  
24 penta, tetra e trifosfatos (CÚNEO; AMAYA-FARFAN; CARRARO, 2000).

25                   O ácido fítico possui propriedades benéficas, como a sua ação  
26 antioxidante, mas também pode ser deletéria ao organismo humano e animal,  
27 principalmente por sua característica quelante, diminuindo a biodisponibilidade de alguns  
28 minerais, como o ferro, cobre, zinco e cálcio, representando um fator antinutricional  
29 (HARLAND; NARULA, 1999).

30                   Sua ação antioxidante provém da alta capacidade de quelar o ferro,  
31 preservando sua solubilidade ao mesmo tempo em que o torna não reativo, pois as reações  
32 catalisadas pelo ferro causam danos oxidativos ao organismo. O ácido fítico altera o  
33 potencial redox do ferro, mantendo-o em sua forma férrica (Fe<sup>3+</sup>), pois sua forma ferrosa

1 (Fe<sup>2+</sup>) promove a produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica,  
2 enquanto que o Fe<sup>3+</sup> fica inerte (GRAF; EMPSON; EATON, 1987).

3                   Em decorrência da redução do número de reações oxidativas  
4 envolvendo o ferro, estudos indicam que o ácido fítico foi capaz de reduzir a ocorrência  
5 de carcinogênese de cólon em humanos (JARIWALLA et al., 1988; GRAF; EATON,  
6 1990). Além disso, a peroxidação de lipídios das membranas eritrocitárias estimuladas  
7 por ferro, podem ser inibidas pelo ácido fítico, sugerindo seu uso como um antioxidante  
8 não tóxico para proteção contra lesões de isquemia e reperfusão miocárdica (KO;  
9 GODIN, 1991).

10                   O farelo de arroz, que contém altos níveis de fitato, foi fornecido para  
11 ratos que consumiam uma dieta com alta concentração de cálcio. A absorção de cálcio  
12 pelo intestino e sua excreção pela urina diminuíram significativamente na segunda a quarta  
13 semanas do experimento. A incidência de cálculos renais também diminuiu em pacientes  
14 tratados com farelo de arroz por um período de três anos (OHKAWA *et al.*, 1984).

## - CAPÍTULO 2 -

### 2.6 MODELO *EX-VIVO* DE AVALIAÇÃO RENAL

O suíno é um modelo experimental amplamente utilizado em decorrência de sua similaridade com a espécie humana e outros mamíferos. Estas semelhanças têm sido observadas tanto na fisiologia como na anatomia comparada, de forma que os sistemas mais utilizados em pesquisas laboratoriais comparadas são gastrointestinal, cardiovascular, respiratório e urinário, assim como outros órgãos como a pele, o fígado e a vesícula biliar (SWINDLE; SMITH, 1998; GUILLOTEAU *et al.*, 2010).

Os estudos evidenciam que o suíno é um modelo animal eficaz em pesquisas, mas além da aplicabilidade da utilização dessa espécie na obtenção de conhecimento de diferentes áreas da ciência, com extrapolação para o homem e outros mamíferos, ainda se trata de um ser vivo, de forma que os aspectos éticos na experimentação animal limita o uso indiscriminado dessa espécie em pesquisas (RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011).

Assim, como alternativa, estudos mais recentes têm utilizado a técnica de explantes, que apesar de ainda ser uma técnica em aprimoramento é um método *ex vivo* que possibilita cultivo de fragmentos de órgãos em placas com meio de cultura, em temperatura semelhante à corpórea, mimetizando as condições do organismo vivo promovendo assim a redução do número de animais utilizados em pesquisas (BANSAL *et al.*, 2009; RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011; BASSO; BRACARENSE, 2013).

Esta técnica, apesar de sua redescoberta recente, foi inicialmente descrita em 1930, quando se incubaram órgãos de embriões de aves que, por aspectos como tamanho reduzido e resistência à hipóxia, facilitaram a sua utilização (FELL; ROBISON, 1930). Já na década de 1950 surgiram os primeiros estudos utilizando tecido renal embrionário de ratos como o primeiro modelo de explante renal, tendo como principal objetivo a compreensão da organogênese dos rins (GROBSTEIN, 1953; GROBSTEIN, 1957).

Posteriormente, a viabilidade do modelo *ex vivo* com tecidos obtidos de ratos adultos foi avaliado, demonstrando a aplicabilidade da técnica em diversos órgãos, conseguindo mantê-los em até nove horas incubados, sendo que a melhor reposta foi obtida com explantes provenientes da traqueia, artérias e ureter (TROWELL, 1959).

1 Buscando aperfeiçoar a técnica, estudos subsequentes fizeram  
2 adaptações adicionando nutrientes ao meio de cultura, associando incubação em  
3 temperatura controlada a 37°C e controle de oxigênio e gás carbônico nas proporções de  
4 95% e 5% respectivamente, de forma que se tornou possível incubar fragmentos de  
5 intestino humano por 24 horas (BROWNING; TRIER, 1969; BASHA; BAZER;  
6 ROBERTS, 1979; HEINZ; CLIVER; DONOHOE, 1987).

7 Com a evolução da técnica, o modelo de explante renal já foi utilizado  
8 na avaliação de terapias com oligonucleotídeos modificados (ROTHENPIELER e  
9 DRESSLER, 1993; QUAGGIN *et al.*, 1997), indutores teciduais (KISPERT *et al.*, 1998;  
10 SCHUCHARDT *et al.*, 1996), bloqueadores de anticorpos (VEJA *et al.*, 1996; ROGERS  
11 *et al.*, 1993), exposição a agentes farmacológicos (FISHER *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*,  
12 1999) e infecção por retrovírus (HERZLINGER *et al.*, 1992). Apesar do uso difundido  
13 da técnica de explante, há pouca informação na literatura quanto a melhor metodologia  
14 ou padronização de técnica, de forma que estudos que buscam avaliar o efeito da  
15 composição do meio sobre o crescimento e conservação do explante ainda são necessários  
16 (GUPTA *et al.*, 2003).

#### 17 2.6.1 Vantagens da Técnica

18  
19  
20 Esta metodologia apresenta inúmeras vantagens quando comparadas  
21 aos métodos tradicionais *in vivo*, por permitir a redução do número de animais utilizados,  
22 uma vez que a partir de um único doador obtêm-se vários explantes. Além disso, permite  
23 também um ambiente experimental controlado, a aplicação de doses definidas das  
24 substâncias de interesse diretamente no órgão alvo, a comparação de amostras tratadas e  
25 controle provenientes de um mesmo doador gerando resultados mais fidedignos (KOLF-  
26 CLAUW *et al.*, 2009; RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011).

27 Este método ainda possibilita a avaliação morfológica de diferentes  
28 órgãos, bem como a quantificação por diferentes técnicas de metabólitos teciduais,  
29 hormônios, atividade enzimática, citocinas, produção de proteínas e muco (BASHA;  
30 BAZER; ROBERTS, 1979; LLOYD; KENNEDY; MENDICINO, 1984; KOLF-  
31 CLAUW *et al.*, 2009).

32 Além de todas as vantagens práticas aqui apresentadas, deve-se  
33 considerar a contribuição da técnica em questões bioéticas, visto que o controle no uso  
34 experimental de animais vem sendo crescentemente exigido. Desse modo, a técnica de

1 explante abrange tanto os aspectos éticos como os legais por atender resolução número  
2 30 de 02 de fevereiro de 2016 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação  
3 Animal (CONCEA) e a lei federal 11.794 de outubro de 2008, que preconiza o  
4 planejamento do experimento visando a obtenção do maior número de informações com  
5 uso do menor número de animais (SCHNAIDER; SOUZA, 2003; BASSO;  
6 BRACARENSE, 2013).

7 O conjunto dessas características associado com a evolução da técnica,  
8 onde limitações como tempo de incubação e viabilidade celular têm sido contornadas com  
9 a utilização de novos meios ou aditivos (GUPTA *et al.*, 2003), tem possibilitado pesquisas  
10 com rins e outros tecidos com substâncias tóxicas ou xenobióticos (KOLF-CLAUW *et*  
11 *al.*, 2009; RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011) e diversos patógenos, de modo a  
12 avaliar o mecanismo de ação de toxinas, interação parasito-hospedeiro e respostas  
13 terapêuticas (HERZLINGER *et al.*, 1992; ZHU *et al.*, 1995; POUCKE *et al.*, 2010).

14 Além de todas as características positivas do modelo *ex vivo* aqui já  
15 apresentadas, outro fator importante é que se trata de um modelo menos oneroso quando  
16 comparado aos modelos *in vivo*, que necessitam de um grande número de indivíduos para  
17 que se tenha uma representatividade significativa.

18 Quando se trata de avaliação de metabólitos, biomarcadores ou  
19 quantificação de diferentes substâncias químicas produzidas por determinado tecido, o  
20 modelo *ex-vivo* parece ideal, pois elimina fatores que podem interferir nos resultados  
21 como os fatores endógenos inibidores da atividade enzimática, a produção da mesma  
22 estrutura química por outros tecidos que não são de interesse, interferência da dieta ou  
23 uso de drogas no delineamento do estudo, entre outros (WERNER *et al.*, 1969, CLEMO,  
24 1998).

25 Por isso, segundo Plummer *et al.* (1986) para avaliação enzimática renal  
26 em decorrência de toxicidade, o estudo deve ser primeiramente delineado *in vitro* para  
27 assim entender os mecanismos isolados, sem a interferência de fatores como as condições  
28 de coleta da urina, volume do material analisado, produção por outros tecidos da mesma  
29 enzima e interferência da composição da urina sob o real valor da atividade enzimática  
30 de interesse.

31

## 2.6.2 Limitações da Técnica

O maior limitante da técnica é manter viáveis os tecidos com integridade celular em relação ao tempo de incubação. Isso ocorre pois mesmo que a técnica vise mimetizar as condições *in vivo*, o tecido permanece em situação de hipóxia, portanto têm se buscado aprimorar o método, visando aumentar o tempo de incubação com a preservação das estruturas celulares e morfológicas do órgão (RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011).

Dentre as adaptações que visam melhorar a técnica, tem-se visto em modelo de explantes renais a manipulação na composição dos meios, adição de promotores de crescimento e ambientes com controle de temperatura e gases como gás carbônico e oxigênio. Deste modo, Gupta et al. (2003), avaliando diversos meios de cultura e aditivos, obtiveram melhores resultados com meio DMEM F12<sup>®</sup> adicionado com soro fetal bovino na proporção de 5%, conseguindo manter os tecidos renais viáveis por até 96 horas.

Outra limitação da técnica de explantes renais decorre do processo de incubação em hipóxia induzir por diferentes mecanismos a morte celular por apoptose, limitando o tempo de cultivo. Explantes incubados por 48 horas em meio DMEM F12<sup>®</sup> e 5% de soro fetal bovino apresentaram uma taxa de apoptose de aproximadamente 1000 células/mm<sup>2</sup> (GUPTA *et al.*, 2003). Entretanto, evoluções na técnica recentemente têm permitido, através de ajuste ao meio de cultivo, nova forma de processamento e utilização de aditivos para estender o tempo de cultivo, com manutenção de células viáveis de 3 a 17 dias, mesmo que ainda limitado a análises morfológicas renais (WINBANKS *et al.*, 2011).

Novas possibilidades adaptativas têm-se demonstrado promissoras como o uso de antioxidantes no cultivo dos explantes. Em estudo em que os efeitos antioxidantes do ácido fítico foram avaliados em explantes intestinais, constatou-se uma redução de 37,3% na ocorrência de apoptose em enterócitos em relação ao grupo controle (DA SILVA *et al.*, 2019).

## 2.7 AGENTES NEFROTÓXICOS

Os agentes tóxicos, em sua maioria, estão relacionados à lesão com padrão de necrose tubular aguda, evoluindo para um quadro de insuficiência renal aguda

1 (FREITAS; VEADO; CARREGARO, 2014). A nefrotoxicidade induzida por fármaco  
2 pode ocorrer por diferentes mecanismos, dependendo do fármaco envolvido, sendo  
3 geralmente classificados com base no componente histológico do rim afetado (NOLIN *et*  
4 *al.*, 2010; CHOUDHURY *et al.*, 2006; LAHOTI *et al.*, 2010).

5 Assim, geralmente os antivirais, antibióticos e quimioterápicos promovem lesão  
6 nas células epiteliais dos túbulos renais; já os antiinflamatórios não esteroidais,  
7 imunossupressores, inibidores da enzima conversora de angiotensina e os  $\beta$ -bloqueadores  
8 estão envolvidos em eventos de lesão renal associados a distúrbios hemodinâmicos renais.  
9 As lesões glomerulares e intersticiais geralmente estão associadas ao uso de  
10 antiinflamatórios não esteroidais COX-2 seletivos, lítio e pamidronato (DIPIRO *et al.*,  
11 2010).

12

### 13 2.7.1 Antibióticos

14

#### 15 2.7.1.1 Gentamicina

16

17 Os aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos com importante  
18 aplicabilidade na rotina clínica no tratamento de infecções por agentes gram-negativos  
19 resistentes. Entretanto, sua utilização tem sido limitada em decorrência ao seu potencial  
20 nefrotóxico conhecido há décadas (SANDE; MANDELL, 1985). A atividade deste  
21 antibiótico depende da concentração sérica atingida, sendo considerado um bactericida,  
22 passando por transporte ativo para o citosol celular, onde atua na subunidade 30S do  
23 ribossomo bacteriano, interrompendo a síntese proteica e levando a morte da bactéria  
24 (DRUSANO, 1988).

25 Estima-se que 25% dos pacientes que recebem gentamicina como  
26 agente antimicrobiano em sua terapêutica desenvolvam algum grau de nefrotoxicidade.  
27 Esta droga parece exercer os seus efeitos nefrotóxicos por meio de três mecanismos  
28 gerais: desenvolvimento de necrose tubular aguda, redução de filtração glomerular e  
29 diminuição do fluxo sanguíneo renal. A relação entre a necrose tubular aguda (NTA),  
30 provocada por aminoglicosídeos como a gentamicina é uma das principais causas da  
31 insuficiência renal aguda secundária em cães e gatos (RIVERS *et al.*, 1996; LOPEZ *et*  
32 *al.*, 2011).

33 A gentamicina atua diretamente sob os túbulos contorcidos proximais,  
34 inibindo os transportadores, afetando a reabsorção tubular e comprometendo a viabilidade

1 celular. O primeiro sinal do dano tubular é o aumento da excreção urinária de cálcio,  
2 magnésio e proteínas. Com a progressão do dano ocorre um aumento da excreção de  
3 sódio, potássio e aumento das concentrações da creatinina sérica (LOPEZ *et al.*, 2011).

4 No glomérulo, os aminoglicosídeos induzem a contração mesangial,  
5 diminuindo conseqüentemente a taxa de filtração glomerular (TFG), que  
6 conseqüentemente ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona e a secreção de  
7 vasoconstritores como a endotelina 1 e o tromboxano A2 que, em conjunto com aumento  
8 das espécies reativas de oxigênio, desencadeiam mecanismos de estresse oxidativo  
9 celular ampliando a extensão da lesão renal (WARGO e EDWARDS, 2014).

10 Apesar disso, os aminoglicosídeos ainda fazem parte da terapêutica das  
11 diversas espécies animais, como equinos (VAN DER HARST *et al.*, 2005), cães e gatos,  
12 principalmente em quadros de otites resistentes causadas por *Pseudomonas aeruginosa*  
13 (FARIAS, 2002) e no homem em decorrência da eficácia e baixos custos para o controle  
14 de infecções (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Alterações histológicas renais já são encontradas  
15 com apenas sete dias de administração de gentamicina na dose de 60 mg/kg, sendo  
16 caracterizadas principalmente por discreta a moderada necrose tubular e quando a dose é  
17 de 120 mg/kg ocorre grave necrose tubular, envolvendo principalmente túbulos  
18 contorcidos proximais (SIEBER *et al.*, 2009; HOFFMANN *et al.*, 2010).

19 Em modelos utilizando gentamicina como indutor de nefrotoxicidade e  
20 causador de doença renal aguda, os marcadores cistatina C, NGAL e calbindina  
21 demonstraram ser melhores indicadores de lesão tubular quando comparados com a ureia  
22 e creatinina sérica, bem como outros marcadores de lesão renal. Dentre os marcadores, a  
23 cistatina C foi capaz de distinguir todos os animais tratados dos não tratados,  
24 demonstrando possível potencial em diferenciar doentes de não doentes (HOFFMANN  
25 *et al.*, 2010).

26 Entretanto, um modelo padronizado da avaliação da toxicidade da  
27 gentamicina ainda não é totalmente consolidado, de forma a promover uma segurança de  
28 sua utilização através do acompanhamento de um marcador preditor da eficácia  
29 terapêutica. Este fármaco tem sido amplamente utilizado como indutor de lesão renal em  
30 modelos de avaliação de diferentes biomarcadores, demonstra alta sensibilidade a  
31 algumas enzimas renais como a GGT e a NAG, sendo estas sensíveis em identificar  
32 quadros de nefrotoxicidade induzidos por altas doses deste aminoglicosídeo (GRAUER  
33 *et al.*, 1995).

### 2.7.1.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico macrolítico, utilizado no tratamento de leishmaniose, com potencial atividade antifúngica. Sua utilização tem sido limitada em decorrência do potencial nefrotóxico dessa droga. Seu mecanismo de ação decorre da ligação às membranas celulares, criando canais iônicos que permitem a livre passagem de íons como potássio, promovendo um comprometimento do metabolismo celular, podendo evoluir para morte celular (SANTIN *et al.*, 2006).

Segundo Joly et al. (1989), a modificação da permeabilidade iônica nas células renais altera o transporte de glicose para o meio intracelular, processo esse observado nas células da borda em escova, nos túbulos contorcidos proximais de ratos e coelhos tratados com anfotericina B com consequente permeabilidade a sódio modificada, desencadeando o processo de lesão. Além disso, a lesão decorre de alteração vascular promovida pela droga que induz intensa vasoconstrição, levando a diminuição do fluxo sanguíneo renal e consequente redução da taxa de filtração glomerular. O efeito vasoconstritor deste macrolídeo decorre da promoção da entrada de cálcio para o interior da célula, induzindo a despolarização e contração vascular (NELSON; COUTO, 2011).

Ainda, cães tratados com anfotericina B apresentaram redução da densidade urinária após quatro horas da administração do fármaco e com excreção fracionada de sódio normais, indicando a manutenção da capacidade renal de conservação desse íon. Esses resultados indicam que a perda da capacidade de concentração urinária não está relacionada com a hipotonicidade medular renal e associam o uso de anfoterecina B com desenvolvimento de diabetes insipidus nefrogênico, por induzir uma resposta inadequada a vasopressina (SANTIN *et al.*, 2006).

### 2.7.1.3 Polimixinas

As polimixinas são um grupo de cinco substâncias com atividade antimicrobiana, sintetizadas por cepas de *Bacillus polymyxa*, sendo então denominadas como polimixina A, B, C, D e E. Entretanto, em decorrência da extrema toxicidade das demais, apenas a polimixina B e a polimixina E ou colistina têm sido utilizadas clinicamente (FALAGAS; KASIAKOU, 2005; MENDES; BURDMANN, 2009).

O uso das polimixinas a partir dos anos 1990 teve maior destaque em decorrência do surgimento de super-bactérias resistentes a aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos e

1 quinolonas. A principal barreira para utilização clínica decorre de seu potencial  
2 nefrotóxico, estando principalmente relacionado a quadro de insuficiência renal aguda  
3 com apresentações de hematúria, proteinúria, cilindrúria e oligúria (MENDES;  
4 BURDMANN, 2009).

5 O mecanismo de indução de lesão renal é semelhante a sua ação antimicrobiana,  
6 pois aumentam a permeabilidade da membrana, facilitando o fluxo de cátions, ânions e  
7 água, provocando edema e lise celular e, conseqüentemente evoluindo para NTA e nefrite  
8 intersticial aguda, com perda da função parcial ou total dos rins (PRICE; GRAHAM,  
9 1970)

10

### 11 2.7.2 Micotoxinas

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

Os fungos, em seu metabolismo secundário, biossintetizam e excretam,  
através de um conjunto de vias metabólicas várias substâncias não essenciais para o  
crescimento e sobrevivência do organismo, que por terem ação tóxica a outros organismos  
vivos, são denominadas micotoxinas. A principal via de exposição dos animais a estes  
metabólitos é por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados. Entretanto,  
estes também podem produzir ação tóxica por meio de inalação e contato com a pele  
(CAST, 2003).

Apesar do conhecimento sobre as micotoxinas ser considerado recente,  
a capacidade de fungos causarem doença por meio da ingestão alimentar já é conhecida  
desde a antiguidade. Como exemplo, cita-se o ergotismo, doença causada pela ingestão  
de produtos elaborados a partir de cereais contaminados com escleródios do fungo  
*Claviceps purpurea*, que possui relatos datados da era do império Assírio, denominado  
como “grão louco” (ABRUNHOSA *et al.*, 2012).

Até os anos 1960, poucos esforços haviam sido feitos para reunir as  
informações dispersas sobre micotoxicoses. Em 1969, uma doença ainda não conhecida  
promoveu a morte de milhares de perus na Inglaterra, com quadro de hemorragia interna  
e necrose hepática, chamando atenção da comunidade científica para as micotoxinas e as  
suas implicações na saúde humana e animal, visto que as investigações epidemiológicas  
mostraram que as mortes dos perus decorreram da ingestão de rações contaminadas com  
um metabólito tóxico produzido pelo fungo *Aspergillus flavus*, que posteriormente seria  
descrito como aflatoxina (GOLDBLATT, 1969).

1           As preocupações com a presença de micotoxinas em alimentos  
2 aumentaram a partir do momento que se descobriram novas toxinas e se reuniram dados  
3 da ocorrência natural em alimentos e suas implicações sobre a saúde animal e humana.  
4 Além dos casos de intoxicações agudas, começou-se a pensar em possíveis efeitos  
5 crônicos derivados da ingestão de pequenas quantidades destas toxinas em longo prazo  
6 (ABRUNHOSA *et al.*, 2012).

7           A correlação entre a exposição crônica a determinada micotoxina com  
8 a etiologia de uma doença não é uma tarefa fácil. A etiologia da nefropatia endêmica dos  
9 Balcãs (BEN) foi associada com a exposição à ocratoxina A (OTA) (PFOHL-  
10 LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2007). Em 1977, Krogh e Elling (1977) associaram  
11 uma nefropatia suína com aspectos patológicos e histológicos semelhantes a BEN à  
12 ingestão de ocratoxina A e citrinina.

13           Pavlovic *et al.* (1979) demonstraram que os habitantes de áreas onde a  
14 doença é endêmica apresentavam níveis superiores de ocratoxina A em sua alimentação  
15 quando comparados com habitantes de regiões onde a doença é ausente. No entanto, a  
16 relação etiológica não foi possível, pois a comparação dos níveis séricos de OTA entre  
17 pessoas acometidas e não acometidas com BEN foram contraditórias, gerando resultados  
18 inconclusivos (PETKOVA-BOCHAROVA *et al.*, 1998). Assim, surgiram novas  
19 hipóteses como o envolvimento de processos neoplásicos ou a exposição a  
20 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na água daquela região (OREM *et al.*,  
21 1999).

22           Hoje se sabe que a BEN decorre de uma intoxicação crônica com ácido  
23 aristolóquico, uma toxina produzida por plantas do gênero *Aristolochia*, uma erva  
24 daninha que cresce em meio a plantações de trigo, sendo encontrado elevados índices de  
25 ácido aristolóquico nas farinhas de trigo produzidas naquela região (STIBOROVÁ;  
26 ARLT; SCHMEISER, 2016).

27           O fato de não se conseguir estabelecer com frequência uma relação  
28 direta entre a ingestão de micotoxinas com reconhecidos efeitos tóxicos experimentais  
29 com as doenças de ocorrência natural não limita a importância do conhecimento sobre  
30 estes metabólitos, levantando questões como quais micotoxinas são importantes para a  
31 saúde animal e humana, em que dose, quais os potenciais efeitos sinérgicos ou  
32 antagônicos entre elas e com outras substâncias (SCAGLIONI *et al.*, 2014).

33           O conhecimento dos efeitos sinérgicos e multi-contaminações por  
34 micotoxinas ainda são escassos, particularmente quando restringimos a micotoxinas

1 específicas como os tricotecenos, citrinina e ocratoxina A (SPEIJERS; SPEIJERS, 2004).  
2 Como exemplo, a ingestão crônica de baixas doses de fumonisinas e desoxinivalenol  
3 (DON) levaram tanto a efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos dependendo do  
4 parâmetro avaliado (GRENIER *et al.*, 2011; BRACARENSE *et al.*, 2012).

5 Outro estudo avaliando o efeito sinérgico da co-contaminação com  
6 ocratoxina A e citrinina sobre a função renal de frangos não evidenciou efeitos aditivos  
7 nos quadros de intoxicação aguda (GLAHN *et al.*, 1998). Entretanto, frangos que  
8 receberam por 3 semanas aflatoxina (0,25mg/g) e ocratoxina A (2mg/g) apresentaram  
9 efeitos sinérgicos nas lesões renais (HUFF; DOERR, 1981).

10 A toxicidade de uma micotoxina é dependente de aspectos como  
11 quantidade ingerida, tempo de exposição e sinergia entre as diferentes micotoxinas.  
12 Outros fatores também contribuem na determinação de uma resposta tóxica, como espécie  
13 animal, idade, sexo e estado fisiológico, que resultam em efeitos carcinogênicos,  
14 mutagênicos, teratogênicos, citotóxicos, neurotóxicos, nefrotóxicos, imunossupressores e  
15 estrogênicos (BULLERMAN, 2000).

16 Atualmente conhecem-se mais de 300 tipos de micotoxinas. Entretanto,  
17 algumas delas apresentam uma ocorrência maior nos alimentos e, portanto apresentam  
18 maior importância em questões de saúde animal e humana. As mais relevantes são as  
19 aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), patulina (PAT), as fumonisinas (FBs),  
20 zearalenona (ZEA), os tricotecenos e os alcaloides do ergot, sendo que os principais  
21 gêneros de fungos envolvidos são *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e  
22 *Claviceps* spp. (ABRUNHOSA *et al.*, 2012).

23 Entre as micotoxinas de ocorrência mais comum, a literatura cita com  
24 provável ação nefrotóxica principalmente a ocratoxina A, citrinina (KROGH; ELLING,  
25 1977) e os derivados de tricotecenos, em especial o DON (RUIZ, *et al.*, 2011).

#### 27 2.7.2.1 Tricotecenos

28  
29 Os tricotecenos são um grupo de metabólitos secundários produzidos  
30 por fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Fusarium* spp. Estes compostos são  
31 divididos em quatro grupos denominados A, B, C e D. Os tricotecenos são um grande  
32 grupo formado por mais de 180 micotoxinas com estrutura química semelhante,  
33 denominados compostos sesquiterpenóides de baixo peso molecular, que usualmente

1 contém um anel epóxi em C-12 e C-13 e uma dupla ligação na posição C-9 e C-18  
2 (DESJARDINS *et al.*, 1993).

3 Entre os tricotecenos, os mais comumente encontrados nos alimentos  
4 são diacetoxiscirpenol (DAS), o DON, 3-acetil-desoxinivalenol, nivalenol (NIV) e  
5 fusarenona X (FUSX) (FOROUD; ODO, 2009). Os tricotecenos são encontrados nos  
6 diversos tipos de cereais como trigo, centeio, aveia, milho, arroz e outros. Sua toxicidade  
7 geralmente está associada a reações promovidas pelo grupo epóxi que apresenta em sua  
8 estrutura química, promovendo quadros clínicos com vômito, diarreias, anemias e  
9 podendo levar a morte (ROTTER, 1996).

10 Estas micotoxinas são altamente lesivas as células eucarióticas,  
11 causando a nível celular a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas, por interromper  
12 o funcionamento mitocondrial, interferindo na integridade da membrana celular e  
13 afetando o processo de divisão celular. Além do efeito celular direto, os tricotecenos  
14 apresentam efeitos imunossupressores, imunoestimulantes e predispõe o  
15 desenvolvimento de doenças auto-imunes, ambos os fatores estão envolvidos no  
16 desenvolvimento de nefropatias (FOROUD; EUDES, 2009; ABRUNHOSA *et al.*, 2012).

17 Estas micotoxinas são rapidamente absorvidas pelo intestino delgado,  
18 sendo metabolizada e excretada principalmente na urina, sem se acumular em tecidos  
19 (PRELUSKY *et al.*, 1988; ERIKSEN *et al.*, 2003). Isto, contudo, não impede que em  
20 altas doses possam causar choque e até mesmo levar a morte, sendo que sua dose letal  
21 (DL50) é descrita variando de 27 mg/Kg a 78 mg/Kg dependendo da via de administração  
22 e do tempo de exposição (YOSHIZAWA; MOROOKA, 1973; YOSHIZAWA *et al.*,  
23 1983; FORSELL *et al.*, 1987).

24 Como já mencionado, os tricotecenos atuam inibindo a síntese proteica,  
25 isso ocorre através da ligação da peptil transferase, podendo desencadear uma reação  
26 denominada resposta ao estresse ribotóxico, que ativam proteínas quinases ativadas por  
27 mitogenos (MAPKs), as quais são componentes da cascata de sinalização que regula a  
28 sobrevivência das células ao estresse (IORDANOV *et al.*, 1997).

29 As MAPKs são proteínas que realizam tradução de sinais extracelulares  
30 como, por exemplo, estresse e fatores de crescimento, para a ativação de uma seqüência  
31 de reações intracelulares (HUANG *et al.*, 2010). A cascata de sinalização das MAPKs é  
32 ativada em geral, por diversos estímulos que regulam a produção de citocinas e fatores de  
33 crescimento (ROUX; BLEINS, 2004).

1                   As MAPKs p44/42 (ERK) estão envolvidas na resposta proliferativa  
2 celular mediada por citocinas (MALEMUD, 2007) e sua ativação pode ser observada em  
3 processos de proliferação, morte celular e remodelação de citoesqueleto (CHAMBARD  
4 *et al.*, 2007, DUMESIC *et al.*, 2009). Outra família de MAPKs que está envolvida no  
5 processo de proliferação celular e apoptose é a JNK, sendo também responsável pela  
6 regulação da expressão e ativação de diversos mediadores inflamatórios com TNF $\alpha$ , IL-  
7 2, selectina E e metaloproteinases (MANNING; DAVIS, 2003; RINCON; DAVIS, 2009).  
8 Em estudo prévio, constatou-se que a ingestão de DON ou a exposição de explantes  
9 intestinais ao DON induziu aumento significativo na fosforilação de ERK  $\frac{1}{2}$  e p38  
10 (LUCIOLLI *et al.*, 2013). A p38 está relacionada ao controle da produção de citocinas  
11 como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (AOUADI *et al.*, 2006; WAGNER; NEBREDA, 2009).

12                   DON apresenta toxicidade diferente dependendo da espécie abordada,  
13 desde sinais característicos aos tricotecnos a ausência de sinais. Em espécies mais  
14 sensíveis como os suínos, é comumente associado a quadros como vômito e redução da  
15 ingestão de alimentos. Entretanto, outras espécies como ruminantes e aves demonstram  
16 ser mais resistentes, tolerando elevadas concentrações de DON em suas dietas (PESTKA,  
17 2007). Portanto, a Comissão Europeia recomenda diferentes valores críticos dessa  
18 micotoxina de acordo com a espécie, sendo orientado que os valores sejam no máximo  
19 0,9 mg/kg de alimento (88% de matéria seca) para os porcos e 5 mg/kg de DON (88%  
20 DM) para o gado e aves (SCHULZ *et al.*, 2015).

21                   Schulz *et al.* (2015) em seu estudo com equinos expostos a <5 $\mu$ g/kg de  
22 peso vivo, 50 $\mu$ g/kg de peso vivo e 75 $\mu$ g/kg de peso vivo por 21 dias com objetivo de  
23 avaliar os efeitos do DON na função hepática e renal destes animais, observou  
24 semelhantemente ao observado em suínos (DÄNICKE *et al.*, 2004b). A redução da  
25 ingestão de alimento pelos animais que receberam maior concentração de DON na dieta,  
26 mesmo que a ingestão de volumoso não tenha sido afetada. Quanto a função hepática e  
27 renal os resultados não evidenciaram alterações consistentes, apresentando apenas  
28 diferença significativa nas concentrações de ureia e na atividade da aspartato  
29 aminotransferase (AST) séricos entre o grupo controle e o que recebeu maior  
30 concentração da micotoxina.

31                   Uma das explicações para maior resistência de algumas espécies a DON  
32 dá-se pela sua metabolização a um composto menos tóxico denominado De-  
33 epoxidesoxinivalenol (DOM-1). Este metabólito é comumente encontrado no soro de  
34 ruminantes que consomem alimentos com presença de DON e já relatado em equinos

1 expostos a DON por 21 dias (SCHULZ *et al.*, 2015). Entretanto, em estudo feito em  
2 suínos não foi possível detectar a presença do metabólito DOM-1 no soro, mesmo em  
3 animais que receberam elevadas concentrações de DON na dieta por 7 dias, presumindo  
4 que esta espécie apresenta um rápido trânsito e absorção intestinal dessa micotoxina, ao  
5 contrário que acontece em outras espécies (DÄNICKE *et al.*, 2004a).

6 Em relação aos efeitos do DON sobre os parâmetros bioquímicos e  
7 hematológicos observa-se apenas aumento da relação albumina/globulina sérica e uma  
8 redução discreta do hematócrito de suínos que ingeriram de 0,75 a 3 mg/kg da micotoxina  
9 (ROTTER *et al.*, 1994). Parece que ao atuar diretamente na síntese proteica altera  
10 consequentemente o perfil proteico sérico, sendo que uma diminuição das concentrações  
11 de albumina sérica também foi relatada em suínos expostos a dietas contaminadas com  
12 3,5 mg/kg de DON (BERGSJO *et al.*, 1992).

13 Entretanto, em estudo mais recente utilizando 2,8 mg/Kg de DON por  
14 35 dias em suínos de quatro semanas de idade, não se observaram alterações  
15 hematológicas e bioquímicas em relação ao grupo controle (GRENIER *et al.*, 2011).

16 Apesar de diversas possibilidades de lesão tóxica relacionadas a DON,  
17 estudos *in vivo* e *in vitro*, tem focado principalmente em seus mecanismos de interação  
18 com o sistema imune, digestório e reprodutivo (SPRANDO *et al.*, 2005; ACCENSI *et*  
19 *al.*, 2006; PINTON *et al.*, 2009; GRENIER *et al.*, 2011; LAM-YIM WAN *et al.*, 2013;  
20 WAN; TURNER; EL-NEZAMI, 2013). Sabe-se que DON pode afetar diretamente os  
21 leucócitos através da superexpressão da produção de citocinas e pela indução da apoptose  
22 (ZHOU *et al.*, 1998, ZHOU *et al.*, 2003), está relacionado com a redução da fertilidade,  
23 promovendo redução do hormônio luteinizante e da testosterona e consequente redução  
24 de número de espermatozoides no epidídimo (SPRANDO *et al.*, 2005) e que age  
25 diretamente sobre a barreira intestinal (PINTON *et al.*, 2009).

26 Apesar do conhecimento que DON e seus metabólitos são excretados  
27 pela urina, o impacto dessa micotoxina sobre o tecido renal ainda é pouco explorado,  
28 muitas vezes limitando-se a alterações histológicas, mas sem uma abordagem direcionada  
29 de lesão e função renal (GRENIER *et al.*, 2011; MATEJOVA *et al.*, 2014).

### 30 2.7.2.2 Ocratoxina A

31 A ocratoxina A foi isolada em 1965, ao observar que animais de  
32 laboratório vinham a óbito quando ingeriam milho infectado pelo fungo *Aspergillus*  
33  
34

1 *ochraceus* (VAN DER MERWE *et al.*, 1965). Esta micotoxina é conhecida por suas  
2 propriedades nefrotóxicas.

3           OTA também possui ação teratogênica, mutagênica, neurotóxica,  
4 hepatotóxica e imunotóxica (PFOHL-LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2007). Esta  
5 micotoxina é comumente encontrada em alimentos como trigo, centeio, café, frutos secos,  
6 vinhos e derivados de carne suína, principalmente os que contenham sangue, fígado e rins  
7 (JORGENSEN, 2005).

8           OTA produz alterações histológicas renais sutis na forma de  
9 degeneração de células individuais dos túbulos renais em administrações subcrônicas.  
10 Um estudo que administrou 70 µg/kg de peso vivo de OTA para ratos pelo período de 28  
11 e 90 dias e na dose de 210 µg/kg de peso vivo pelo período de 14, 28 e 90 dias evidenciou  
12 relação da dose com a gravidade da lesão histológica. Os animais que receberam maior  
13 dose apresentavam degeneração celular, com basofilia citoplasmática e cariomegalia,  
14 principalmente em células epiteliais do túbulo proximal (HOFFMANN, *et al.*, 2010).

15           Segundo Krogh e Elling (1977) os principais sinais clínicos  
16 apresentados por suínos intoxicados com OTA são poliúria e polidipsia.  
17 Microscopicamente, os principais achados iniciais são degeneração de túbulo proximal  
18 com descamação de células epiteliais, acompanhadas por fibrose intersticial. Em fases  
19 posteriores observa-se atrofia tubular, membranas basais glomerulares espessadas e  
20 hialinização de alguns glomérulos.

21           Nas avaliações de rotina da função renal OTA não mostrou efeito sobre  
22 a ureia sérica ou o volume urinário, proteína urinária, glicose, ou da creatinina sérica  
23 (RACHED *et al.*, 2007). Hoffmann *et al.* (2010) relataram apenas um aumento de 1,2  
24 vezes da creatinina sérica após 90 dias de administração de OTA na dose de 210 µg/kg  
25 de peso vivo.

26           Portanto, marcadores mais sensíveis para avaliação das lesões  
27 provocadas por esta micotoxina têm sido objeto de estudo. Os efeitos desta micotoxina  
28 sobre a expressão do RNAm de KIM-1 induziu uma maior transcrição e mais rápida nos  
29 animais que receberam OTA (RACHED *et al.*, 2008). Em concordância com os dados da  
30 expressão gênica, outro estudo evidenciou aumento do KIM-1 urinário em ratos tratados  
31 com OTA a 70 µg/kg de peso vivo por 28 dias, mesmo as lesões histológicas sendo de  
32 discreta a moderada intensidade (HOFFMANN, *et al.*, 2010).

33           Outros marcadores de lesão renal incluindo NGAL, osteopontina e  
34 clusterina foram também significativamente induzidas pela OTA. Entretanto, na

1 avaliação da expressão do RNAm destes marcadores, não apresentaram a mesma resposta  
2 de aumento. Isto sugere que as rápidas mudanças no nível de RNAm destes genes em  
3 resposta ao estresse celular não são necessariamente acompanhadas por um aumento dos  
4 níveis de proteínas e secreção pela urina (RACHED *et al.*, 2008). Assim, um estudo que  
5 avaliou um painel com 10 marcadores de lesão renal em ratos submetidos a tratamento  
6 com OTA evidenciou que a melhor resposta, com maior precocidade e sensibilidade foi  
7 obtida pela dosagem urinária de KIM-1. A microalbuminúria também estava elevada nos  
8 animais que receberam doses elevadas por longos períodos, mas foi incapaz de detectar  
9 lesão promovida por doses menores (HOFFMANN, *et al.*, 2010).

### 11 2.7.3 Antinflamatórios Não Esteroidais

12  
13 Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) são amplamente  
14 utilizados na medicina humana e veterinária, pois inibem a síntese de prostaglandinas a  
15 partir do ácido araquidônico através da inibição da ciclooxigenases (COX), controlando  
16 o processo inflamatório estando também associados a atividade analgésica. A isoenzima  
17 COX-1 está associada a manutenção da homeostase fisiológica do organismo, e em  
18 especial a renal (NARITA *et al.*, 2007).

19 Os antiinflamatórios também podem induzir uma variedade de  
20 alterações prejudiciais a função renal, tornando o rim o segundo órgão mais afetado por  
21 essa classe de medicamentos. Entre os principais grupos de risco de utilização desses  
22 fármacos, estão pacientes com redução da taxa de filtração glomerular por hipovolemia,  
23 insuficiência cardíaca congestiva, cirrose e nefróticos com proteinúria (HARRIS;  
24 BRATER, 2001; MICHELIN *et al.*, 2006)

25 Sabe-se que o uso de AINES é crescente entre a população,  
26 principalmente idosa, em decorrência do seu fácil acesso (MELGAÇO *et al.*, 2010). A  
27 utilização desses medicamentos tem sido responsável por elevados números de  
28 intervenções hospitalares, sendo reportado como causa de 100.000 a 400.000 internações  
29 por ano nos Estados Unidos da América e 10.000 hospitalizações e 2.000 mortes no Reino  
30 Unido em 1999 ( BRICKS; SILVA, 2005; RAHMAN *et al.*, 2006). No Brasil, no período  
31 de 1994 a 1997, aproximadamente 10% das intoxicações medicamentosas reportadas em  
32 seis diferentes centros médicos especializados foram ocasionados pelo uso de AINES  
33 (BRICKS; SILVA, 2005).

1 Os mecanismos de nefrotoxicidade desses anti-inflamatórios têm sido  
2 mais detalhados nos últimos anos, as apresentações histológicas são necrose tubular  
3 aguda, nefrite intersticial aguda e glomerulonefrite membranosa (EJAZ; BHOJANI;  
4 JOSHI, 2004). Isso ocorre pois, ao inibir as ciclooxigenases e conseqüentemente a síntese  
5 de prostaglandinas, os AINES impedem o efeito vasodilatador das prostaglandinas,  
6 desencadeando vasoconstrição renal, que pode evoluir para necrose tubular. Também  
7 impedem o efeito inibitório sobre os linfócitos T, com conseqüente liberação de citocinas  
8 pró-inflamatórias e aumento da síntese de leucotrienos, também pró-inflamatórios,  
9 levando a quadros de nefrites e perda de proteínas por proteinúria em decorrência a um  
10 aumento da permeabilidade vascular (GALESIC *et al.*, 2008).

11 A homeostase renal é desequilibrada com o uso dos AINES, já que as  
12 prostaglandinas são substâncias responsáveis pela manutenção do fluxo sanguíneo renal  
13 e a taxa de filtração glomerular, especialmente nos casos em que há redução do volume  
14 sanguíneo efetivo. As prostaglandinas PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> sintetizadas pelo próprio rim  
15 causam vasodilatação, diminuição da resistência vascular e melhora da perfusão renal,  
16 com redistribuição do fluxo sanguíneo do córtex para a região justamedular (OATES *et*  
17 *al.*, 1988). Deste modo, estudos demonstram que mesmo o uso de AINES seletivos COX-  
18 2 também são deletérios a função renal, visto que a ciclooxigenase 2 nos rins está  
19 associada a manutenção da homeostase hidroeletrólítica, enquanto a ciclooxigenase 1  
20 exerce papel funcional de manutenção da filtração glomerular (MICHELIN *et al.*, 2006).

21 Os efeitos dos inibidores seletivos da COX-2 sobre a função renal ainda  
22 não foram completamente esclarecidos, mas segundo Vogt *et al.* (2009), pacientes que  
23 fizeram uso de Rofecoxibe apresentaram proteinúria por glomerulopatia e aumento  
24 reversível da creatinina sérica em decorrência da redução da taxa de filtração glomerular.  
25 Nesse estudo não foram avaliados possíveis desequilíbrios eletrolíticos ou marcadores  
26 precoces de lesão tubular.

27 Os rins desempenham a função de depuração do organismo e  
28 conseqüentemente acabam expostos a uma série de substâncias nocivas. Assim, entender  
29 os impactos da exposição aguda e crônica a essas substâncias no tecido renal tem  
30 despertado interesse científico. Sabe-se que tais processos de lesão são irreversíveis em  
31 muitos casos, de modo que a prevenção é a melhor alternativa terapêutica para as  
32 nefropatias. Para tanto, encontrar marcadores que demonstrem precocemente perda da  
33 função ou alteração da estrutura renal e identificar substâncias com potencial de protetor  
34 renal tem tido interesse crescente.

## 2.8 REFERÊNCIAS

ACCENSI, F. et al. Ingestion of low doses of deoxynivalenol does not affect hematological, biochemical, or immune responses of piglets. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 7, p. 1935–1942, 2006.

ANDRADE, S.C.; DEZOTI, C.; SHIBUYA, C.A.; WATANABE, M.; VATTIMO, M.F.F. Insuficiência renal aguda isquêmica: efeitos comparativos do alopurinol e n-acetilcisteína como antioxidantes. **The International Brazilian Journal of Urology**, Rio de Janeiro, v.26, n.2, p.69-75, 2004.

AOUADI, M.; BINETRUY, B.; CARON, L.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; BOST, F. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. **Biochimie**, v.88, n.9, p. 1091-8, set. 2006.

BALIGA, R.; UEDA, N.; WALKER, P.D.; SHAH, S.V. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. **Drug Metab. Rev.** v.31, n.1, p.971–997, 1999.

BANSAL, D, AVE, P, KERNEIS, S, FRILEUX, P, BOCHE, O, BAGLIN, A. C, DUBOST, G, LEGUERN, A. S, PREVOST, M. C, BRACHA, R, MIRELMAN, D, GUILLE, N. N, LABRUYE, R. E. An *ex-vivo* human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.3, n.11, p.1-11, 2009.

BARBOSA, K.B.F.B.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr. Campinas**. v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BASHA, S. M. M, BAZER, W. F, ROBERTS, M. R. The secretion of a uterine specific, *purple phosphatase* by cultured explants of porcine endometrium dependency upon the state of pregnancy of the donor animal. **Biology of Reproduction**, v.20, n.3, p. 431-441, 1979.

BASSO, K.M.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Explantes teciduais: um modelo redescoberto na experimentação animal. Tissue explants: a model rediscovered in animal experiments. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.6, supl. 2, p. 3951-3958, 2013.

BERGSJO, B.; MATRE, T.; NAFSTAD, I. Effects of diets with graded levels of deoxynivalenol on performance in growing pigs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n.10, p. 752-8, dec. 1992.

BRACARENSE, A.P.F.L.; LUCIOLI, J.; GRENIER, B.; PACHECO, G.D.; MOLL, W.D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I.P. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, v.3, p.1776-1786, 2012

BRAUNBERG, R.C.; GANTT, O.; BARTON, C.; FRIEDMAN, L. In Vitro Effects of the Nephrotoxins Ochratoxin A and Citrinin upon Biochemical Function of Porcine Kidney. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 470, p. 464–470, 1992.

1  
2 BRICKS, Lucia Ferro; SILVA, Clovis Artur Almeida da. Toxicidade dos  
3 antiinflamatórios não-hormonais. *Pediatria (São Paulo)*, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 181-  
4 193, 2005.

5  
6 BROWN, S.A., BARSANTI, J.A., CROWELL, W.A. Gentamicin associated acute renal  
7 failure in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Iowa, v.  
8 186, n. 7, p. 686-690, 1985.

9  
10 BROWN, S.A., RAKICH, P.M., BARSANTI, J.A. *et al.* Fanconi syndrome and acute  
11 renal failure associated with gentamicin therapy in a dog. *Journal of the American*  
12 *Animal Hospital Association*, v. 22, p. 635-640, 1986.

13  
14 BROWNING, T. H, TRIER, J. S. Organ culture of mucosal biopsies of human small  
15 intestine. *The Journal of Clinical Investigation*, v.48, n.8, p.1423-1432, 1969.

16  
17 BULLERMAN, L.B. Mycotoxins/Classification. En: **Encyclopedia of food**  
18 **microbiology**. (Eds) Robinson RK, Batt CA, Patel PD. Academic Press, London, p.1512-  
19 1519, 2000.

20  
21 CAST. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. **Council for Agriculture**  
22 **Science and Technology, CAST**, Ames, Iowa, USA, 10 ed., 2003.

23  
24 CHAMBARD, J.C.; LEFLOCH, R.; POUYSSÉGUR, J.; LENORMAND, P. ERK  
25 implication in cell cycle regulation. *Biochimica and Biophysica Acta*, v.1773, n.8,  
26 p.1299–310, ago. 2007.

27  
28 CHEW, D.J.; DIBARTOLA, S.P.; SCHENCK, P.A. *Diseases of the Glomeulus In:*  
29 **Canine and Feline Nephrology and Urology**, 2<sup>a</sup> ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2011,  
30 218-239 p.

31  
32 CLEMO, F. A. Urinary enzyme evaluation of nephrotoxicity in the dog. **Toxicologic**  
33 **Pathology**, Philadelphia, v. 26, n. 1, p. 29-32, 1998.

34  
35 COLLE, A., TAVERA, C., LAURENT, P., LEUNG-TACK, J., GIROLAMI, J.P., Direct  
36 radioimmunoassay of rat cystatin C: increased urinary excretion of this cysteine proteases  
37 inhibitor during chromate nephropathy. *J. Immunoassay*, v.11, p.199–214, 1990.

38  
39 CONTI, M., MOUTEREAU, S., ZATER, M., LALLALI, K., DURRBACH, A.,  
40 MANIVET, P., ESCHWEGE,P., LORIC, S. Urinary cystatin C as a specific marker of  
41 tubular dysfunction. *Clin. Chem. Lab. Med*, v.44, p.288–291, 2006.

42  
43 CORTADELLAS, O. **Manual de Nefrologia e urologia Clínica Canina e Felina**. 2<sup>a</sup> ed.  
44 São Paulo (SP): Medvet; 2011. 245p.

45  
46 CÚNEO, F.; AMAYA-FARFAN, J.; CARRARO, F. Distribuição dos fitatos em farelo de  
47 arroz estabilizado e tratado com fitase exógena. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.  
48 20, n. 1, p. 94-98, 2000.

49

- 1 D'AMICO G, BAZZI C. Pathophysiology of proteinuria. **Kidney Int**, v.63, p.809-825,  
2 2005.
- 3
- 4 DÄNICKE, S.; GOYARTS, T.; VALENTA, H.; RAZZAZI, E.; BÖHM, J. On the effects  
5 of deoxynivalenol (DON) in pigs feed on growth performance, nutrients utilization and  
6 DON metabolism. **J Anim Feed Sci**, v.13, p.539–556, 2004a.
- 7
- 8 DÄNICKE, S.; VALENTA, H.; KLOBASA, F.; DÖLL, S.; GANTER, M.;  
9 FLACHOWSKY, G. Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated wheat in  
10 diets for fattening pigs on growth performance, nutrient digestibility, deoxynivalenol  
11 balance and clinical serum characteristics. **Arch Anim Nutr** v.58, p.1–17, 2004b.
- 12
- 13 DA SILVA, E. et al. Phytic Acid Decreases Oxidative Stress and Intestinal Lesions  
14 Induced by Fumonisin B1 and Deoxynivalenol in Intestinal Explants of Pigs. **Toxins**, v.  
15 11, n. 1, p. 18, 2019.
- 16
- 17 DESJARDINS, A.E.; HOHN, T.M.; McCORMICK, S.P. Trichothecene biosynthesis in  
18 *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. **Microbiological Reviews**, v.57,  
19 n.3, p. 595-604, set. 1993.
- 20
- 21 DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **Clinical**  
22 **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v.17, n.6, p.1503-1520,  
23 2006.
- 24
- 25 DIANZANI, M. & BARRERA, G. Pathology and physiology of lipid peroxidation and  
26 its carbonyl products, in Alvarez S and Evelson P (ed), Free Radical pathophysiology, pp  
27 19-38, **Transworld Research Network**, Kerala, India, 2008.
- 28
- 29 DILKIN, P.; MALLMANN, C.A. **Mycotoxin and mycotoxicosis in swine**. LAMIC,  
30 183p., 2011.
- 31
- 32 DOST, K.; TOKUL, O. Determination of phytic acid in wheat and wheat products by  
33 reverse phase high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 558,  
34 n. 1–2, p. 22–27, 2006.
- 35
- 36 DRUSANO, G.L. Role of pharmacokinetics in the outcome of infections. **Antimicrob**  
37 **Agents Chemother.** v.32, n.3, p.289-297, 1998.
- 38
- 39 DUMESIC, P.A.; SCHOLL, F.A.; BARRAGAN, D.I.; KHAVARI, P.A. ERK1/2 MAP  
40 kinases are required for epidermal G2/M progression. **The Journal of Cell Biology**,  
41 v.185, n.3, p.409–422, maio, 2009.
- 42
- 43 EJAZ, P.; BHOJANI, K.; JOSHI, V. R. NSAIDs and kidney. **Journal of Association of**  
44 **Physicians of India**, v. 52, n. 8, p. 632–640, 2004.
- 45
- 46 ELLIOT, J; WATSON, A. D. J. Chronic Kidney Disease: Staging and Management. In:  
47 BONAGURA, J. D.; TWEDT, D. C. **Kirk's Current Veterinary Therapy XIV**. St.  
48 Louis: Saunders, 2009. Cap. 192, p. 883-889.
- 49

- 1 ELLIS, B.G.; PRICE, R.G.; TOPHAM, J.C. The effect of papillary damage by  
2 ethyleneimine on kidney function and some urinary enzymes in the dog. **Clienz. Bid.**  
3 **Irireracr.**, v.7, p.131-142, 1973.  
4
- 5 ERIKSEN, G.; PETTERSSON, H.; LINDBERG, J. Absorption, metabolism and  
6 excretion of 3-acetyl DON in pigs. **Archives of Animal Nutrition**, v.57, n.5, p.335 - 345,  
7 out. 2003.  
8
- 9 FALAGAS, E. M.; KASIAKOU, S. K. Colistin: The revival of polymyxins for the  
10 management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clin Infect Dis**,  
11 v.40, n.10, p.1333-1341, 2005.  
12
- 13 FAUCET-MARQUIS, V.; PONT, F.; STORMER, F.; RIZK, T.; CASTEGNARO, M.;  
14 PFOHL-LESZKOWICZ, A. Evidence of a new dechlorinated OTA derivative formed in  
15 opossum kidney cell cultures after pre-treatment by modulators of glutathione pathways.  
16 Correlation with DNA adducts formation. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.  
17 50, n. 6, p. 531-542, 2006.  
18
- 19 FELL, H. B.; ROBISON, R. The development and phosphatase activity *in vivo* and *in*  
20 *vitro* of the mandibular skeletal tissue of the embryonic fowl. **Biochemical Journal**, v.24,  
21 n.6, p.1905-1921, 1930.  
22
- 23 FINCO D.R. Kidney function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. **Clinical**  
24 **Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego, CA: Academic Press, p.441–484, 1995.  
25
- 26 FISHER, C.E.; MICHAEL, L.; BARNETT, M.W.; DAVIES, J.A. Erk MAP kinase  
27 regulates branching morphogenesis in the developing mouse kidney. **Development**,  
28 v.128, n.21, p.4329-4338, 2001.  
29
- 30 FOROUD, N.A.; EUDES, F. Trichothecenes in Cereal Grains. **International Journal of**  
31 **Molecular Sciences**, v.10, p.147-173, 2009.  
32
- 33 FORSELL, J.H.; JENSEN, R.; TAI, J.H.; WITT, M.; LIN, W.S.; PESTKA, J.J.  
34 Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-  
35 acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. **Food and Chemical Toxicology**, v.25, n.2,  
36 p.155-62, fev. 1987.  
37
- 38 FORTERRE S, RAILA J, SCHWEIGERt F.J. Protein profiling of urine from dogs with  
39 renal disease using Protein Chip analysis. **J Vet Diagn Invest**, p.271-277,v.16, 2004.  
40
- 41 FREITAS, G. C.; VEADO, J. C. C.; CARREGARO, A. B. Testes de avaliação de injúria  
42 renal precoce em cães e gatos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 411–426, 2014.  
43
- 44 GALESIC, K. et al. Minimal change disease and acute tubular necrosis caused by  
45 diclofenac. **Nephrology**, v. 13, n. 1, p. 87–88, 2008.  
46
- 47 GLAHN, R.P.; WIDEMAN JR, R.F.; EVANGELISTI, J.W.; HUFF, W.E. Effects of  
48 ochratoxin A alone and in combination with citrinin on kidney function of single comb  
49 White Leghorn pullets. **Poultry Science**, v.67, p.1034-1042, 1988.  
50

- 1 GOLDBLATT, L.A. Aflatoxin: scientific background, control, and implications.  
2 **Academic Press**, New York, v.35,1969.  
3
- 4 GOSSETT, K.A.; TNRNWALD, G.H.; KERNEY, M.T.; GRECO, D.S.; CLEGHORN,  
5 B. Evaluation of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio from spot samples of urine  
6 supernatant, as an indicator of urinary enzyme excretion in dogs. **Am. J. Ver. Res.** v.48,  
7 p.455-457, 1987.  
8
- 9 GRAF, E.; EATON, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology**  
10 **and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 61–69, 1990.  
11
- 12 GRAF, E.; EMPSON, K. L.; EATON, J. W. Phytic Acid: A Natural Antioxidant. **The**  
13 **Journal of Biological Chemistry**. v. 262, n. 24, p. 11647–11650, 1987.  
14
- 15 GRAUER, G. F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats.  
16 **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 581–596,  
17 2005.  
18
- 19 GRAUER, G.F; GRECO, D.S; BEHREND, E.N.; MANI, I.; FETTMAN, M.J.; ALLEN,  
20 T.A. Estimation of quantitative enzymuria in dogs with gentamicin-induced  
21 nephrotoxicosis using urine enzyme/creatinine ratios from spot urine samples. **J Vet**  
22 **Intern Med**, v.9, n.5, p.324-327,1995.  
23
- 24 GRECO, D.S.; TURNWALD, G.H.; ADAMS, R.; GOSSETT, K.A.; KEARNEY, M.;  
25 CASEY, H. Urinary  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity in dogs with gentamicin-induced  
26 nephrotoxicity. **Am. J. Ver. Res.**, v.46, p.2332-2335,1985.  
27
- 28 GRENIER, B.; BRACARENSE, A.P.F.L.; LUCIOLI, J.; PACHECO, G.D.;  
29 COSSALTER, A.M.; MOLL, W.D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I.P. Individual  
30 and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisin in piglets.  
31 **Molecular Nutrition Food Research**, v.55, p.761-771, 2011.  
32
- 33 GROBSTEIN, C. Inductive epithelio-mesenchymal interaction in cul-tured organ  
34 rudiments of the mouse. **Science**, v.118, p. 52-55, 1953.  
35
- 36 GROBSTEIN, C. Some transmission characteristics of the tubule-inducing influence on  
37 mouse metanephrogenic mesenchyme. **Exp Cell Res**, v.13, p. 575-587,1957.  
38
- 39 GRUNE, T.; SOMMERBURG, O.; PETRAS, T.; SIEMS, W.G. Postanoxic formation of  
40 aldehydic lipid peroxidation products in human renal tubular cells. **Free Radic. Biol.**  
41 **Med.** v.18, n. 21–27, 1995.  
42
- 43 GUILLOTEAU, P.; ZABIELSKI, R.; HAMMON, H. M.; METGES, C. C. Nutritional  
44 programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man?  
45 **Nutrition Research Reviews**, v.23, n.1, p. 4-22, 2010.  
46
- 47 GUPTA, I.; PISCIONE, T.D.; GRISARU, S.; PHAN, T.; MACIAS-SILVA, M.; ZHOU,  
48 X.; WHITESIDE, C.; WRANA, J.L.; ROSENBLUM, N.D. Protein kinase A is a negative  
49 regulator of renal branching morphogenesis and modulates inhibitory and stimulatory  
50 bone morphogenetic proteins. **J Biol Chem**, v. 274, n.37, p. 26305-26314, 1999.

- 1  
2 GUPTA, I.R, LAPOINTE, M, YU, O.H. Morphogenesis during mouse embryonic kidney  
3 explant culture. **Kidney International**, v.63, p.365–376, 2003.  
4
- 5 GUTOWSKI, M., KOWALCZYK, S. “A study of free radical chemistry: their role and  
6 pathophysiological significance,” **Acta Biochimica Polonica**, v.60, n.1, p.1-16, 2013.  
7
- 8 HALLIWELL, B.; GUTERIDGE, J.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th ed.  
9 New 7 York: Oxford University, 851p. 8, 2007.  
10
- 11 HARLAND, B. F.; NARULA, G. Food phytate and its hydrolysis products. **Nutrition**  
12 **Research**, v. 19, n. 6, p. 947–961, 1999.  
13
- 14 HARRIS, C. J.; BRATER, D. C. Renal effects of cyclooxygenase-2 selective inhibitors.  
15 **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 10, n. 5, p. 603–610, 2001.  
16
- 17 HEIENE, R.; MOE, L.; MOLMEN, G. Calculation of urinary enzyme excretion, with  
18 renal structure and function in dogs with pyometra. **Research in Veterinary Science**,  
19 London, v.70, n.2, p.129-137, 2001.  
20
- 21 HEINZ, B. A.; CLIVER D. O.; DONOHOE, B. Enterovirus replication in porcine ileal  
22 explants. **Journal of General Virology**, v.68, p.2495-2499, 1987.  
23
- 24 HENNEMANN, C. R. de A. et al. Atividade da Gama Glutamil Transpeptidase Urinária,  
25 Dosagens Séricas de Uréia e Creatinina como Meios Diagnósticos Auxiliares na  
26 Nefrotoxicidade Induzida por Aminoglicosídeo em Cães. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p.  
27 237–244, 1997.  
28
- 29 HERZLINGER, D.; KOSECKI, C.; MIKAWA, T.; AL-AWQATI, Q. Metanephric  
30 mesenchyme contains multipotent stem cells whose fate is restricted after induction.  
31 **Development**, v.114, n.3, p.565-572,1992.  
32
- 33 HIGASHIYAMA, N.; NISHIYAMA, S.; ITOH, T.; NAKAMURA, M. (1983). Effect of  
34 castration on urinary N-acetyl-P-D-glucosaminidaslee vels in male beagles. **Ren.**  
35 **Plzysiol. Base**, v.16, n.1, p.226-23 1983.  
36
- 37 HOFFMANN, D.; FUCHS, T.C.; HENZLER, T.; MATHEIS, K.A.; HERGET, T.;  
38 DEKANT, W.; HEWITT, P.; MALLY, A. Evaluation of a urinary kidney biomarker  
39 panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. **Toxicology**, v.277, p.49–58,  
40 2010.  
41
- 42 HOFMANN, W.; GUDER, W.G. A diagnostic programme for quantitative analysis of  
43 proteinuria. **J Clin Chem Clin Biochem**. v.27, n.9, p. 589-600, 1989.  
44
- 45 HOU, Y. J. et al. Mycotoxin-Containing Diet Causes Oxidative Stress in the Mouse.  
46 **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 2–8, 2013.  
47
- 48 HUANG, P.; HAN, J.; HUI, L. MAPK signaling in inflammation associated cancer  
49 development. **Protein and Cell**, v.1, n.3, p. 218-26, mar. 2010.  
50

- 1 HUFF, W.E.; DOERR, J.A. Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler  
2 chickens. **Poultry Science**. v.60, p.550-555, 1981.  
3
- 4 ICHIMURA, T.; BONVENTRE, J.V.; BAILLY, V.; WEI, H.; HESSION, C.A.; CATE,  
5 R.L.; SANICOLA, M. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell  
6 adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal  
7 cells after injury. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 7, p. 4135-4142, 1998.  
8
- 9 IORDANOV, M.S.; PRIBNOW, D.; MAGUN, J.L.; DINH, T.H.; PEARSON,  
10 J.A.; CHEN, S.L.; MAGUN, B.E. Ribotoxic stress response: activation of the stress-  
11 activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by  
12 sequence-specific RNA damage to the  $\alpha$ -sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. **Molecular**  
13 **and Cellular Biology**, v.17, n.6, p.3373-81, jun. 1997.  
14
- 15 JARIWALLA, R. J.; SABIN, R.; LAWSON, S.; BLOCH, D. A.; PRENDER, M.;  
16 ANDREWS, V.; HERMAN, Z. S. Effects of dietary phytic acid (phytate) on the incidence  
17 and growth rate of tumors promoted in Fischer rats by a magnesium supplement.  
18 **Nutrition Research**. v. 8, p. 813-827, 1988.  
19
- 20 JOCHMANS, I.; LERUT, E.; VAN PELT, J.; MONBALIU, D.; PIRENNE J. Circulating  
21 AST, H-FABP, and NGAL are early and accurate biomarkers of graft injury and  
22 dysfunction in a preclinical model of kidney transplantation. **Annals of Surgery**, v.254,  
23 n.5, p. 784-791, 2011.  
24
- 25 JOLY, V. et al. Incorporation of amphotericin B (AMB) into liposomes alters AMB-  
26 induced acute nephrotoxicity in rabbits. **Journal of Pharmacology and Experimental**  
27 **Therapeutics**, v. 251, n. 1, 1989.  
28
- 29 JORGENSEN, K. Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food: A  
30 review of EU occurrence data. **Food additives & contaminants**, v.22, p.26-30, 2005.  
31
- 32 KARAMAN, A.; TURKMEN, E.; GURSUL, C.; TAS, E.; FADILLIOGLU, E.  
33 Prevention of renal ischemia/reperfusion-induced injury in rats by leflunomide.  
34 **International Journal of Urology**, Osaka, v.13, p.1434-1441, 2006.  
35
- 36 KATALINIC, V. et al. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues  
37 determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric  
38 reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and**  
39 **Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 140, n. 1, p. 47-52, 2005.  
40
- 41 KERR, M.G. Substâncias nitrogenadas. In: **Exames Laboratoriais em Medicina**  
42 **Veterinária, Bioquímica Clínica e Hematologia**. São Paulo: Roca, 2003, p. 119.  
43
- 44 KISPERT, A, VAINIO, S, MCMAHON, A. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial  
45 transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. **Development**,  
46 v.125, p. 4225-4234,1998.  
47
- 48 KO, K. M.; GODIN, D. V. Effects of phytic acid on the myoglobin-t-butylhydroperoxide-  
49 catalysed oxidation of uric acid and peroxidation of erythrocyte membrane lipids.  
50 **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 101, n. 1, p. 23-29, 1991.

- 1 KOLF-CLAUW, M.; CASTELLOTE, J.; JOLY, B.; BOURGES-ABELLA, N.;  
2 RAYMOND-LETRON, I.; PINTON, P.; OSWALD, I. P. Development of a pig jejunal  
3 explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol:  
4 histopathological analysis. **Toxicology in Vitro**, v.23, n.8, p.1580-1584, 2009.  
5
- 6 KROGH, P.; ELLING, P. Mycotoxic Nephropathy. **Vet.Sci.Commun.**, v.1, p.51-65,  
7 1977.  
8
- 9 LAM-YIM WAN, M. et al. Modulation of porcine  $\beta$ -defensins 1 and 2 upon individual  
10 and combined Fusarium toxin exposure in a swine jejunal epithelial cell line. **Applied**  
11 **and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2225–2232, 2013.  
12
- 13 LI, H.; XING, L.; ZHANG, M.; WANG, J.; ZHENG, N. The Toxic Effects of Aflatoxin  
14 B1 and Aflatoxin M1 on Kidney through Regulating L-Proline and Downstream  
15 Apoptosis. **Hindawi Biomed Research International**, v. 2018, n. 1, p. 1–11, 2018.  
16
- 17 LIANGOS, O., TIGHIOUART, H., PERIANAYAGAM, M.C., KOLYADA, A., HAN,  
18 W.K., WALD, R., BONVENTRE, J.V., JABER, B.L. Comparative analysis of urinary  
19 biomarkers for early detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass.  
20 **Biomarkers**, v.14, p. 423–431, 2009.  
21
- 22 LIMONCIEL, A.; JENNINGS, P. A review of the evidence that ochratoxin A is an Nrf2  
23 inhibitor: Implications for nephrotoxicity and renal carcinogenicity. **Toxins**, v. 6, n. 1, p.  
24 371–379, 2013.  
25
- 26 LLOYD, C.; KENNEDY, J. R.; MENDICINO, J. Regulation of the synthesis of mucin  
27 glycoproteins in swine trachea explants. **In Vitro**, v.20, n.5, p.416-432, 1984.  
28
- 29 LOFT, S. et al. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. **Biochem. Soc.**  
30 **Trans.**, v.36, n.5, p.1071-6, 2008.  
31
- 32 MALDONADO, P. D. et al. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced  
33 oxidative stress and renal damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 3, p.  
34 317–324, 2003.  
35
- 36 MALEMUD, C.J. Inhibitors of stress-activated protein/mitogen-activated protein kinase  
37 pathways. **Current Opinion in Pharmacology**, v.7, n.3, p. 339-343, jun. 2007.  
38
- 39 MANNING, A.M.; DAVIS, R.J. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to  
40 gold? **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, n.7, p. 554–65, jul. 2003.  
41
- 42 MATEJOVA, I. et al. The Effect of Mycotoxin Deoxynivalenol on Haematological and  
43 Biochemical Indicators and Histopathological Changes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus*  
44 *mykiss*). **BioMed Research International**. v. 2014, p. 4–9, 2014.  
45
- 46 MATTEUCCI, E., GIAMPIETRO, O. To store urinary enzymes: How and how long?  
47 **Kidney Int**. v.46, p.58-59, 1993.  
48
- 49 MEHTA, R.L.; KELLUM, J.A.; SHAH, S.V.; MOLITORIS, B.A.; RONCO, C.;  
50 WARNOCK, D.G.; LEVIN, A. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to  
improve outcomes in acute kidney injury. **Crit Care**. v.11, n.2, 2007.

- 1 MELCHERT, A.; LAPOSY, C.B.; MOTTA, Y.P.; GARCIA, A.C.F.Z. Gama-glutamil  
2 transpeptidase urinária como indicador de insuficiência renal aguda induzida por  
3 gentamicina em cães. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**,  
4 Umuarama, v. 10, n. 2, p. 111-116, 2007.
- 5  
6 MELGAÇO, S. S. C. et al. Nefreotoxicidade dos anti-inflamatórios não esteroidais.  
7 **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 4, p. 382–390, 2010.
- 8  
9 MENDES, C. A. C.; BURDMANN, E. a. Polimixinas: revisão com ênfase na sua  
10 nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p. 752–759,  
11 2009.
- 12  
13 MISHRA, J.; MA, Q.; KELLY, C.; MITSNEFES, M.; MORI, K.; BARASCH, J.;  
14 DEVARAJAN, P. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following  
15 transplantation. **Pediatric Nephrology**, v. 21, n. 6, p. 856–863, 2006.
- 16  
17 MICHELIN, A. D. F. et al. Toxicidade renal de inibidores seletivos da ciclooxigenase-2:  
18 celecoxib e rofecoxib. **Rev. Cienc. Méd**, v. 15, n. 4, p. 321–332, 2006.
- 19  
20 NAKAMURA, M.; ITOH, T.; MIYATA, K.; HIGASHIYAMA, N.; TAKESUE, H.;  
21 NISHIYAMA, S. Difference in urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity between  
22 male and female beagle dogs. **Ren Physiol**, v.6, n.3, p.130-133, 1983.
- 23  
24 NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, K. O.; KOSHINO, NAKASHIMA, A. S.; FUJINO;  
25 TSUJIMOTO, H. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. **Clinical**  
26 **Pathology**, Tokyo, v. 70, n. 2, p. 127-133, 2008.
- 27  
28 NARITA, T.; SATO, R.; MOTOISHI, K.; TANI, K.; NAITO, Y.; HARA, S. The  
29 interaction between orally administered non-steroidal anti-inflammatory drugs and  
30 prednisolone in healthy dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.69,  
31 n.4, p.353-363, 2007.
- 32  
33 NELSON, R.W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4. ed. Rio de  
34 Janeiro: Elsevier, 2010, 1468 p.
- 35  
36 NICKOLAS, T.L.; O'ROURKE, M.J.; YANG, J.; SISE, M.E.; CANETTA,  
37 P.A.; BARASCH, N.; BUCHEN, C.; KHAN, F.; MORI, K.; GIGLIO,  
38 J.; DEVARAJAN, P.; BARASCH J. Sensitivity and specificity of a single emergency  
39 department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for  
40 diagnosing acute kidney injury. **Annals of Internal Medicine**, v. 148, n. 11, p.810-819,  
41 2008.
- 42  
43 OATES, J. A. et al. CLINICAL IMPLICATIONS OF PROSTAGLANDIN AND  
44 THROMBOXANE A2 FORMATION. **The New England journal of medicine**, v. 319,  
45 n. 12, p. 761–767, 1988.
- 46  
47 OHKAWA, T. et al. Rice bran treatment for patients with hypercalciuric stones:  
48 experimental and clinical studies. **J Urol**, v. 132, n. 6, p. 1140–1145, 1984.
- 49  
50 OZBEK, E. Induction of oxidative stress in kidney. **International Journal of**

- 1 **Nephrology**, v. 2012, n. 1, p. 1–9, 2012.
- 2
- 3 PALACIO, J.; LISTE, F.; GASCON, M. Enzymuria as na index of renal damage in canine  
4 leishmaniasis. **Veterinary Record**, London, v.140, n.18, p.477-480, 1997.
- 5
- 6 PANCOAST, S. J. Aminoglycoside antibiotics in clinical use. **Medical Clinics of North  
7 America**, Philadelphia, v. 72, n. 3, p. 581–612, 1988.
- 8
- 9 PARIKH, C.R.; DEVARAJAN, P.; ZAPPITELLI, M.; SINT, K.; THIESSEN-  
10 PHILBROOK, H.; LI, S.; KIM, R.W.; KOYNER, J.L.; COCA, S.G.; EDELSTEIN,  
11 C.L.; SHLIPAK, M.G.; GARG, A.X.; KRAWCZESKI, C.D. Postoperative biomarkers  
12 predict acute kidney injury and poor outcomes after pediatric cardiac surgery. **Journal of  
13 the American Society of Nephrology**, v. 22, n.9, p. 1737-1747, 2011.
- 14
- 15 PARIKH, C.R.; MISHRA, J.; THIESSEN-PHILBROOK, H.; DURSUN, B.; MA,  
16 Q.; KELLY, C.; DENT, C.; DEVARAJAN, P.; EDELSTEIN, C.L. Urinary IL-18 is an  
17 early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. **Kidney  
18 International**, v. 70, n. 1, p. 199-203, 2006.
- 19
- 20 PAVLOVIC, M.; PLESTINA, R.; KROGH, P. Ochratoxin a Contamination of Foodstuffs  
21 in an Area With Balkan (Endemic) Nephropathy. **Acta Pathol. Microbiol**, v.87, p. 243-  
22 246, 1979.
- 23
- 24 PERES, L. A. B. et al. Biomarkers of Acute Kidney Injury. **Brazilian Journal of  
25 Nephrology**, v. 35, n. 3, p. 229–236, 2013.
- 26
- 27 PESTKA, J.J. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. **Anim Feed  
28 Sci Techn**, v.137, p.283–298, 2007.
- 29
- 30 PETKOVA-BOCHAROVA, T.; STOICHEV, I.I.; CHERNOZEMSKY,  
31 I.N.; CASTEGNARO, M.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Formation of DNA adducts in  
32 tissues of mouse progeny through transplacental contamination and/or lactation after  
33 administration of a single dose of ochratoxin A to the pregnant mother. **Environ Mol  
34 Mutagen**. v.32, n.2, p.155-162, 1998.
- 35
- 36 PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R.A.; Ochratoxin A: An overview on  
37 toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition & Food  
38 Research**, v.51, p. 61-99, 2007.
- 39
- 40 PINTON, P. et al. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier  
41 permeability and reduces claudin expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**,  
42 v. 237, n. 1, p. 41–48, 2009.
- 43
- 44 PLAAMI, S. Myoinositol Phosphates: Analysis, Content in Foods and Effects in  
45 Nutrition. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, n. 7, p. 633–647, 1997.
- 46
- 47 POLZIN, D. J. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease  
48 in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.23, n.2, p.  
49 205–215, 2013.
- 50

- 1 POLZIN, D., OSBORNE, C., O'BRIENT, T. Moléstia dos rins e ureteres. In:  
2 ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1992,  
3 v.4. cap. 108. p. 2047-2138.  
4
- 5 POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A.; ADAMS, L.D.; O'BRIEN, T.D. Dietary management  
6 of canine and feline chronic renal failure. **Veterinary Clinics of North America: Small  
7 Animal Practice**, v.19, n.3, p.539–560, 1989.  
8
- 9 POUCKE, S. G. M. V.; NICHOLLS, J. M.; NAUWYNCK, H. J.; REETH, K. V.  
10 Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants  
11 and association with sialic acid distribution. **Virology Journal**, v.7, p.1-14, 2010.  
12
- 13 PRELUSKY, D.B.; HARTIN, K.E.; TRENHOLM, H.L.; MILLER, J.D.  
14 Pharmacokinetic fate of carbon-14-labeled deoxynivalenol in swine. **Fundamental and  
15 Applied Toxicology**, v.10, n.2, p.276–86, 1988.  
16
- 17 PRESSLER, B. M. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats.  
18 **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 43, n. 6, p. 1193–  
19 1208, 2013.  
20
- 21 PRICE, R.G. Measurement of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase and its isoenzymes in urine.  
22 methods and clinical applications. **European Journal of Clinical Chemistry and  
23 Clinical Biochemistry**, v.30, p.693-705, 1992.  
24
- 25 PRICE, D. J. E.; GRAHAM, D. I. Effects of Large Doses of Colistin Sulphomethate  
26 Sodium on Renal Function. **British Medical Journal**, v. 4, n. 1, p. 525–527, 1970.  
27
- 28 QUAGGIN, S, YEGER, H, IGARASHI, P. Antisense oligonucleotides to Cux-1, a cut-  
29 related homeobox gene, cause increased apoptosis in mouse embryonic kidney cultures.  
30 **J Clin Invest**, v.99, p.718-724,1997.  
31
- 32 RAAB, W.P. Diagnostic value of urinary enzyme determinations. **Clinical Chemistry**,  
33 v.18, n.1, p.5-25, 1972.  
34
- 35 RACHED, E., HOFFMANN, D., BLUMBACH, K., WEBER, K., DEKANT,  
36 W.,MALLY, A. Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to  
37 ochratoxin a in vivo and in vitro. **Toxicol. Sci.** v.103, p.371–381, 2008.  
38
- 39 RAHMAN, M. M. et al. Review Articles Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs- An  
40 Overview. **J. Medicine**, v. 7, n. 1, p. 20–31, 2006.  
41
- 42 RAILA, J.; FORTERRE, S.; KOHN, B.; BRUNNBERG, L.; SCHWEIGERT, F.J.  
43 Effects of chronic renal disease on the transport of vitamin A in plasma and urine of dogs.  
44 **Am J Vet Res**; v.64, n.7, p.874–879. 2003a.  
45
- 46 RAILA, J.; NEUMANN, U.; SCHWEIGERT, F.J. Immunochemical localization of  
47 megalin, retinol-binding protein and Tamm-Horsfall glycoprotein in the kidneys of dogs.  
48 **Vet Res Commun**. v.27, p.125–135, 2003b.

- 1 RANDALL, K. J, TURTON, J, FOSTER, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue:  
2 a review of methods and applications. **Cell Biology and Toxicology**, v.27, n.4, p.267-  
3 284, 2011.
- 4
- 5 REWA, O.; BAGSHAW, S. M. Acute kidney injury - epidemiology, outcomes and  
6 economics. **Nature Reviews**, v. 10, n. 4, p. 193–207, 2014.
- 7
- 8 REUSCH, C.; VOCHEZER, R.; WESCHTA, E. Enzyme activities of urinary alanine  
9 animopeptidase (AAP) and N-acetyl-P-D-glucosaminidase (NAG) in healthy dogs. **J.**  
10 **Vef. Med. Assoc.** v.38, p.90-98, 1991.
- 11
- 12 RIELLA, M. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 3ed. Koogan G,  
13 São Paulo, p.456-476, 1996.
- 14
- 15 RINCON, M.; DAVIS, R.J. Regulation of the immune response by stress-activated  
16 protein kinases. **Immunological Reviews**, v. 228, n.1, p.212–24, mar. 2009.
- 17
- 18 RIVERS, B. J.; WALTER, P. A.; O'BRIEN, T. D.; KING, V. L.; POLZIN, D. J.  
19 Evaluation of urine gamma-glutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio as a diagnostic  
20 tool in an experimental model of aminoglycoside-induced acute renal failure in the dog.  
21 **Journal of the American Hospital Association**, Lakewood, v. 32, n. 4, p. 323-336,  
22 1996.
- 23
- 24 ROGERS, S.; RYAN, G.; PURCHIO, A.F.; HAMMERMAN, M.R. Metanephric  
25 transforming growth factor-b1 regulates nephrogenesis in vitro. **Am J Physiol**, v.264,  
26 n.6, p.996-1002, 1993.
- 27
- 28 ROSA, D.B.S.K.; VEADO, J.C.C; TASSINI, L.E.S.; ANJOS, T. M.; LEMPEK, M.R.  
29 Glomerulonefropatia em injúria renal aguda e doença renal crônica. Parte I –  
30 Caracterização. **Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos**  
31 **Animais e Animais de Estimação**, Curitiba, V. 12, n.42, p. 408-4014, 2014.
- 32
- 33 ROSA, D.B.S.K.; VEADO, J.C.C.; TASSINI, L.E.S.; ANJOS, T.M.; LEMPEK, M.R.  
34 Glomerulonefropatia em injúria renal aguda e doença crônica. Parte II – Diagnóstico e  
35 tratamento. **Medvep -Revista científica de medicina Veterinária – Pequenos Animais**  
36 **e Animais de Estimação**, Curitiba, v. 43, n. 13, p. 70-79, 2015.
- 37
- 38 ROTHENPIELER, U, DRESSLER, G. Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium  
39 conversion during kidney development. **Development**, v.119, p.711-720,1993.
- 40
- 41 ROTTER, B.A.; THOMPSON, B.K.; LESSARD, M.; TRENHOLM, H.L.;  
42 TRYPHONAS, H. Influence of low level exposure to Fusarium mycotoxins on selected  
43 immunological and hematological parameters in young swine. **Fundamental and**  
44 **Applied Toxicology**, v.23, n.1, p.117-24, jul. 1994.
- 45
- 46 ROUX, P.P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinase: a family of  
47 protein kinases with diverse biological functions. **Microbiology and Biology Molecular**  
48 **Reviews**, v. 68, n. 2, p. 320-344, jun. 2004.
- 49
- 50 RUIZ, M. J. et al. Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney

- 1 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2718–2724, 2011.
- 2
- 3 SANDBERG, A.; CARLSSON, N.; SVANBERG, U. Effects of Inositol Tri-, Tetra-,  
4 Penta-, and Hexaphosphates on In Vitro Estimation of Iron Availability. v. 54, n. 1, p.  
5 159–161, 1989.
- 6
- 7 SANTIN, F.; MOUTINHO, F.Q.; AMARAL, A.S.; TAKAHIRA, R.K.  
8 Acompanhamento laboratorial da função renal de cães sadios tratados experimentalmente  
9 com doses terapêuticas de anfotericina B. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1816-  
10 1823, 2006.
- 11
- 12 SATO, R.; SOETA, S.; MIYAZAKI, M.; SYUTO, B.; SATO, J.; MIYAKE,  
13 Y.; YASUDA, J.; OKADA, K.; NAITO, Y. Clinical availability of urinary N-acetyl-  
14 beta-D-glucosaminidase index in dogs with urinary diseases. **J Vet Med Sci**, v. 64, n.4,  
15 p.361-365, 2002.
- 16
- 17 SCAGLIONI, P.T.; BECKER-ALGERI, T.; DRUNKLER, D.; BADIALE-FURLONG,  
18 E. Aflatoxin B1 and M1 in milk, **Analytica Chimica Acta**, v.829, p. 68-74, 2014.
- 19
- 20 SCHNAIDER, T. B., SOUZA, C. Aspectos éticos da experimentação animal. **Revista**  
21 **Brasileira de Anestesiologia**, v.2, p. 278-285, 2003.
- 22
- 23 SCHUCHARDT, A.; D'AGATI, V.; PACHNIS, V.; COSTANTINI, F. Renal agenesis  
24 and hypodysplasia in ret-k-mutant mice result from defects in ureteric bud development.  
25 **Development**, v.122, n.6, p.1919-1929,1996.
- 26
- 27 SCHULZ, A.K.; KERSTEN, S.; DÄNICKE, S.; COENEN, M.; VERVUERT, I. Effects  
28 of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat on feed intake and health status of  
29 horses. **Mycotoxin Res.**, v.31, p.209–216, 2015.
- 30
- 31 SCHUSTER, A. et al. ROLE OF LIPID PEROXIDATION IN THE TOXICITY OF T-2  
32 TOXIN T-2 TOXIN. **Toxicon**, v. 25, n. 12, p. 1321–1328, 1987.
- 33
- 34 SHAH, S.V.; BARICOS, W.H.; BASCI, A. Degradation of human glomerular basement  
35 membrane by stimulated neutrophils. Activation of a metalloproteinase(s) by reactive  
36 oxygen metabolites. **J. Clin. Invest.** v.79, n.1, p.25–31, 1987.
- 37
- 38 SHEMESH, O.; GOLBETZ, H.; KRISS, J.P.; MYERS, B.D. Limitations of creatinine as  
39 a filtration marker in glomerulopathic patients. **Kidney Int.** v.28, n.5, p.830-838, 1985.
- 40
- 41 SILBERSTEIN, J.L.; SPRENKLE, P.C.; SU, D.; POWER, N.E.; TARIN, T.V.; EZELL,  
42 P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) levels in response to unilateral  
43 renal ischaemia in a novel pilot two-kidney porcine model. **BJU International**, v.112, p.  
44 517-525,2013.
- 45
- 46 SILVA MELO, D. A.; SACIURA, V.C.; POLONI, J.A.; OLIVEIRA, C.S.; FILHO,  
47 J.C.; PADILHA, R.Z.; REICHEL, C.L.; NETO, E.J.; OLIVEIRA, R.M.; D'AVILA,  
48 L.C.; KESSLER, A.; DE OLIVEIRA, J.R. Evaluation of renal enzymuria and cellular  
49 excretion as an marker of acute nephrotoxicity due to an overdose of paracetamol in  
50 Wistar rats. **Clinica chimica acta**, Amsterdam, v. 373, n. 1-2, p. 88-91, 2006.

- 1 SIMSEK, I.; PAY, S.; PEKEL, A.; DINC, A.; MUSABAK, U.; ERDEM, H.; SENGUL,  
2 A. Serum Proinflammatory Cytokines Directing T Helper 1 Polarization in Patients With  
3 Familial Mediterranean Fever, **Rheumatology International**, v.27, n.9, p. 807-811,  
4 2007.
- 5  
6 SINGRI, N.; AHYA, S. N.; LEVIN, M. L. Acute renal failure. **Journal of the American  
7 Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 289, n. 6, p. 747-751, 2003.
- 8  
9 SKALOVA, S. The diagnostic role of urinary N-acetyl-beta-Dglucosaminidase (NAG)  
10 activity in the detection of renal tubular impairment. **Acta Medica (Hradec Kralove)**.  
11 v.48, p.75–80, 2005.
- 12  
13 SMELTZER, S.C.; BARE, B.; HINKLE, J.L.; CHEEVER, K.H. **Brunner and  
14 Suddarth's Textbook of Medical-Surgical Nursing**. 1312.p. 2010.
- 15  
16 SMET, P.M.Y; MEYER, E; MADDENS, B.E.J.; DUCHATEAU, L.; DAMINET, S.  
17 Urinary Markers in Healthy Young and Aged Dogs and Dogs with Chronic Kidney  
18 Disease. **J Vet Intern Med**, v.24, p.65-72, 2010.
- 19  
20 SODRÉ, F.L.; COSTA, J.C.B.; LIMA, J.C.C.; Avaliação da função e da lesão renal:um  
21 desafio laboratorial Evaluation of renal function and damage: a laboratorial challenge.  
22 **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, p.  
23 329-337, 2007.
- 24  
25 SPRANDO, R. L. et al. Characterization of the effect of deoxynivalenol on selected male  
26 reproductive endpoints. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 623–635, 2005.
- 27  
28 STIBOROVÁ, M.; ARLT, V. M.; SCHMEISER, H. H. Balkan endemic nephropathy: an  
29 update on its aetiology. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 11, p. 2595–2615, 2016.
- 30  
31 STRIZ, E.; KRASNA, E.; HONSOVA, J.; LACHA, K.; PETRICKOVA, M.;  
32 JARESOVA, A.; LODEREROVA, R.; BOHMOVA, S.; VALHOVA, A.; SLAVCEV,  
33 S.; VITKO, D. Interleukin 18 (IL-18) upregulation in acute rejection of kidney allograft.  
34 **Immunology Letters**, v. 99, n.1, p. 30-35, 2005
- 35  
36 SWINDLE, M. M.; SMITH, A. C. Comparative and physiology of the pig. **Scandinavian  
37 Journal of Laboratory Animal Science**, v.25, p. 11-21, 1998.
- 38  
39 TASSINI, L.E.S.; VEADO, J.C.C.; LEME, F.O.P.; ROSA, D.B.S.K.; ANJOS, T.M.;  
40 LEMPEK, M.R.; ARAÚJO, M.C.R. N-acetyl-β-d-glucosamidase (NAG) para  
41 identificação de injúria renal, como sinalizador precoce de insuficiência renal aguda –  
42 Revisão de literatura. **Medvep -Revista científica de medicina Veterinária – Pequenos  
43 Animais e Animais de Estimação**, Curitiba, v. 43, n. 13, p. 80-88, 2015.
- 44  
45 TIMMEREN, M.M.; VAN DEN HEUVEL, M.C.; BAILLY, V.; BAKKER, S.J.L.; VAN  
46 GOOR, H.; STEGERMAN, C.A. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human  
47 renal disease. **Journal of Patology**, v. 12, n. 2, p. 209-217, 2007.
- 48  
49 TOPPING, M.D.; FORSTER, H.W.; DOLMAN, C.; LUCZYNSKA, C.M.; BERNARD,  
50 A.M. Measurement of urinary retinol-binding protein by enzyme-linked immunosorbent

- 1 assay, and its application to detection of tubular proteinuria. **Clin Chem**, v.32, p.1863-  
2 1866,1986.
- 3
- 4 TROWELL, O. A. The culture of mature organs in a synthetic medium. **Experimental**  
5 **Cell Research**, v.16, n.1, p.118-147, 1959.
- 6
- 7 UCHIDA, K., GOTOH, A. Measurement of cystatin-C and creatinine in urine.  
8 **Clin.Chim. Acta**, v.323, p.121–128, 2002.
- 9
- 10 UECHI, M.; NOGAMI, Y.; TERUI, H.; NAKAYAMA, T. ISHIKAWAE, R., WAKAO,  
11 Y. valuation of urinary enzymes in dogs with early renal disorder. **The Journal of**  
12 **Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.56, n.3, p.555-556, 1994.
- 13
- 14 VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L.; SCOTT, D.B.; THERON J.J.  
15 Ochratoxin A. A toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**,  
16 v.205, p. 1112-1113, 1965.
- 17
- 18 VEADO, J.C.C. Hemodiálise – por que empregar a técnica em animais. **Medvep -Revista**  
19 **científica de medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**,  
20 Curitiba, v. 1, n. 1, p. 53-57, 2003.
- 21
- 22 VOGT, L. et al. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition reduces proteinuria in  
23 renal patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 4, p. 1182–1189, 2009.
- 24
- 25 WAGNER, E.F.; NEBREDA, A.R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways  
26 in cancer development. **Nature Review Cancer**, v.9, n.8, p.537–49, ago. 2009.
- 27
- 28 WAKI, M.F.; MARTORELLI, C.R.; MOSKO, P.E.; KOGIKA, M.M. Classificação em  
29 estágios da doença renal crônica em cães e gatos - abordagem clínica , laboratorial e  
30 terapêutica. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2226–2234, 2010.
- 31
- 32 WALDROP, J. E. Urinary electrolytes, solutes, and osmolality. The Veterinary Clinics  
33 of North America. **Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 38, n. 3, p. 503 512, 2008.
- 34
- 35 WAN, L. Y. M.; TURNER, P. C.; EL-NEZAMI, H. Individual and combined cytotoxic  
36 effects of Fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1)  
37 on swine jejunal epithelial cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, n. April, p. 276–  
38 283, 2013.
- 39
- 40 WARGO, K. A.; EDWARDS, J. D. Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity. **Journal**  
41 **of Pharmacy Practice**, v. 27, n. 6, p. 573–577, 2014.
- 42
- 43 WERNER, H.L.; MARUHN, D.; ATOBA, M. Use of gel filtration in the assay of urinary  
44 enzymes. **Journal of Chromatography A**. v.40, n.1, p.254-263, 1969.
- 45
- 46 WINBANKS, C. E. et al. Explanting Is an Ex Vivo Model of Renal Epithelial-  
47 Mesenchymal Transition. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, n. 1, p.  
48 1–7, 2011.
- 49
- 50 YOSHIZAWA, T. Trichothecenes: Chemical, Biological, and Toxicological Aspects. In

- 1 **Developments in Food Science**; Ueno, Kodansha Ltd., Tokyo, Japan, p.195 – 209, 1983.  
2
- 3 YOSHIZAWA, T.; MOROOKA, N. Deoxynivalenol and its mono-acetate: New  
4 mycotoxins from *Fusarium roseum* and moldy barley. **Agricultural and Biological**  
5 **Chemistry**, v.37, p.2933-2934, 1973.  
6
- 7 ZATZ, R; SEGURO, A.C.; MALNIC, G. **Bases fisiológicas da nefrologia**. 1. ed. São  
8 Paulo: Atheneu, 2011, 299p.  
9
- 10 ZHOU, H.; YAN, D.; PESTKA, J.J. Induction of cytokine gene expression in mice after  
11 repeated and subchronic oral exposure to vomitoxin (Deoxynivalenol): differential toxin-  
12 induced hyporesponsiveness and recovery. **Toxicology Applied and Pharmacology**,  
13 v.151, n.2, p.347–58, ago. 1998.  
14
- 15 ZHOU, H.R.; ISLAM, Z.; PESTKA, J.J. Rapid, sequential activation of mitogen-  
16 activated protein kinases and transcription factors precedes proinflammatory cytokine  
17 mRNA expression in spleens of mice exposed to the trichothecene vomitoxin.  
18 **Toxicological Sciences**, v.72, n.1, p. 130-42, mar. 2003.  
19
- 20 ZHU, H.; HAREL, J.; JACQUES, M.; FAIRBROTHER, J. M. Interaction with pig ileal  
21 explants of *Escherichia coli* 045 isolates from swine with post weaning diarrhea.  
22 **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.59, n.2, p.118-123, 1995.  
23
- 24 XIAO, H.; TAN, B.E.; WU, M.M.; YIN, Y.L.; LI, T.J.; YUAN, D.X.; LI, L. Effects of  
25 composite antimicrobial peptides in weanling piglets challenged with deoxynivalenol: II.  
26 Intestinal morphology and function. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 10, p. 4750–  
27 4756, 2013.  
28

### 1 3. OBJETIVOS

2

#### 3 3.1 OBJETIVO GERAL

4

5 Avaliar a aplicabilidade do modelo *ex vivo* de explante renal, na determinação de  
6 nefrotoxicidade à exposição aguda à gentamicina e desoxinivalenol e renoproteção do  
7 ácido fítico por meio de biomarcadores, histologia e estresse oxidativo.

8

#### 9 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

10

- 11 a) Padronizar a técnica de cultivo e avaliação histológica, bioquímica e de estresse  
12 oxidativo no modelo *ex vivo* de explantes renais;
- 13 b) Avaliar a ação nefrotóxica do desoxinivalenol no modelo de explantes;
- 14 c) Avaliar a ação renoprotetora do ácido fítico frente a exposição a gentamicina e  
15 desoxinivalenol.
- 16 d) Caracterizar as lesões renais por meio da histopatologia, determinando critérios  
17 de avaliação renal (escore tecidual);
- 18 e) Validar a análise de biomarcadores creatinina e gama-glutamilttransferase (GGT)  
19 por meio de sobrenadante de incubação de explantes renais, verificando a  
20 eficiência como método diagnóstico de alterações renais em modelo agudo;
- 21 f) Verificar a promoção de resposta oxidativa renal em modelo de explante frente a  
22 exposição a gentamicina, desoxinivalenol, e ácido fítico.

1 **4 ARTIGO A**2 **STANDARDIZATION OF THE KIDNEY EXPLANT TECHNIQUE FOR**  
3 **TOXICOLOGICAL TESTS**  
45 Weslem G. Suhett<sup>1</sup>, Juliana R. Gerez<sup>2</sup>, Milton James J. Valdiviezo<sup>3</sup>, Victor Hugo B.  
6 Marutani<sup>3</sup>, Amanda L. Hasuda<sup>4</sup>, Waldiceu Aparecido V. Junior<sup>5</sup>, Karina Keller M.C.  
7 Flaiban<sup>6</sup>, Ana Paula F.R. L. Bracarense<sup>6</sup>  
89 <sup>1</sup> State University of Londrina, Department of Veterinary Clinics, Londrina, Brazil; <sup>2</sup>  
10 State University of Londrina, Department of Histology, Londrina, Brazil; <sup>3</sup> State  
11 University of Londrina, Master of Science in Animal Science, Londrina, Brazil; <sup>4</sup> State  
12 University of Londrina, Doctor's Degree of in Animal Science, Londrina, Brazil; <sup>5</sup> State  
13 University of Londrina, Department of Pathological Sciences, Londrina, Brazil; <sup>6</sup> State  
14 University of Londrina, Department of Preventive Veterinary Medicine, Londrina, Brazil.  
1516  
17 **Abstract**  
1819 Kidneys play an essential role in the maintenance of homeostasis, so knowledge about  
20 the toxic effects of xenobiotics on the kidneys as well as the mechanisms of injury is of  
21 scientific relevance. The evaluation of nephrotoxicity uses mainly laboratory animals,  
22 however, alternatives to *in vivo* evaluation are necessary. *Ex vivo* models using tissue  
23 explants have shown promising results. The objective of this work was to evaluate and  
24 standardize the use of renal explants of pigs for toxicological tests. A total of 384 kidney  
25 explants was evaluated; 192 explants obtained from young animals and 192 explants from  
26 finishing animals. These samples were allocated in 3 groups: control zero hours (C0),  
27 control 4 hours (C4) and a group exposed to gentamicin (EG). The explants were  
28 incubated for 4 h at 37°C in six-well plates containing culture medium (C4) or culture  
29 médium plus gentamicin (10 mM). The C0 group was not incubated. After incubation,  
30 the explants were fixed, processed for histological assay and analyzed through a lesion  
31 score based on 10 criteria. The levels of gamma-glutamyltransferase (GGT) and  
32 creatinine in the supernatant of the culture medium were quantified two and four hours  
33 after incubation. The antioxidant capacity (GSH, ABTS, FRAP) and the oxidative stress  
34 biomarker (TBARS) in the explants were also evaluated. The data were submitted to  
35 statistical analysis of variance by Tukey tests a significant increase in the lesion score was  
36 observed in EG group (7,37±0.68) when compared to C0 (1.38±0.37) and C4 (2.33±0.33)  
37 groups both in piglets and finishing animals. Similarly, a significant increase in GGT and  
38 creatinine levels was verified in EG group of finishing pigs, however no difference was  
39 observed in young animals when compared to C4 group. Increased levels of TBARS were  
40 observed in EG group when compared to C0 and 4 groups in adult pigs ( $p < 0.05$ ). In  
41 piglets a significant decrease in GHS was verified in EG group in comparison with the  
42 other groups. The results indicate that the model of renal explants of pigs is adequate to  
43 evaluate the effects of toxic substances on kidney, besides being an alternative to the *in*  
44 *vivo* model, meeting the current ethical needs that reduce the number of animals used in  
45 researches.  
4647 **Key-words:** Ex vivo, Nephrotoxin, Kidney diseases

## 1 4.1 Introduction

2  
3 The kidney is an organ of multiple functions such as filtration,  
4 reabsorption, homeostasis, endocrinological and metabolic functions. The fundamental  
5 unit is the nephron, formed by the glomerulus and multiple tubular structures responsible  
6 for reabsorption and secretion of ions and other substances (SODRÉ; COSTA; LIMA,  
7 2007). This characteristic facilitates the action of diverse substances, that directly or  
8 indirectly, through different mechanisms, promoting homeostatic imbalance and loss of  
9 renal function, thus characterizing a nephrotoxic event (MENDES; BURDMANN, 2009).

10 Acute renal injury frequently affects humans and animals. In humans,  
11 an occurrence of 22% was reported, increasing up to 50.1% in a hospitalized population  
12 (HILL et al., 2016; TEJERA et al., 2017; POSTON; KOYNER, 2019). In pets, a  
13 prevalence of 7% in dogs and 20% in cats was stated; and 36% of the affected cats may  
14 evolve to death due to complications or euthanasia (FREITAS; VEADO; CARREGARO,  
15 2014)

16 The complex interaction of kidney structures makes it difficult to study  
17 the morphological and pathological mechanisms of renal lesions induced by different  
18 substances, even with the use of cell culture (GUPTA; LAPOINTE; YU, 2003). An  
19 interesting alternative to reduce the use of animals in clinical trials, as well as unnecessary  
20 people exposure to harmful substances in *in vivo* studies, is the explant culture. Other  
21 advantages are increased environmental control, use of predefined doses directly on the  
22 tissue of the study, and less uncontrolled variability among the experimental units  
23 (sampling of a large number of explants from a single animal) thereby serving the  
24 bioethical principles: reduction, refinement, and replacement in animal experiments  
25 (RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011).

26 The explant model proved to be effective for different organs such as  
27 intestine, liver, cartilage and ovaries (GUPTA; LAPOINTE; YU, 2003; BASSO;  
28 BRACARENSE, 2015; LING et al., 2016; GEREZ et al., 2017). However, most studies  
29 regarding nephrotoxicity still using models such as mice or cell cultures (FAUCET-  
30 MARQUIS et al., 2006; KOUADIO et al., 2013); data concerning renal explants are  
31 scarce and mainly focused on morphogenesis (GUPTA; LAPOINTE; YU, 2003;  
32 WINBANKS et al., 2011).

33 Besides the commonly occurrence of acute renal injuries, the  
34 progression to a chronic disease is estimated in 13.4% (Hill et al., 2016). Renal disease is

1 considered multifactorial, leading to the challenge of an early diagnosis and knowledge  
2 about the potential nephrotoxic agents in order to minimize possible exposures.  
3 Medicines, as nonsteroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics, such gentamicin can  
4 reduce renal blood flow and glomerular filtration, resulting in acute tubular necrosis  
5 (MELGAÇO et al., 2010).

6 Thus, one of the current concerns is to understand the different  
7 mechanisms of injury in order to anticipate the clinical events early, since the diagnosis  
8 is based on serum and urinary biomarkers such as urea, creatinine, microproteinuria and  
9 urinary  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT-Urinary) (FREITAS; VEADO; CARREGARO,  
10 2014). In this context, the aim of the present study was to standardize the explant  
11 technique to evaluate renal toxicity. To achieve this, biochemical, histological and  
12 oxidative stress response assays were performed in explants exposed to gentamicin, a  
13 well-known nephrotoxic agent.

## 15 **4.2 Material and Methods**

### 17 *4.2.1 Explants*

18  
19 In order to compare the effect of age in tissue viability, two experiments  
20 were designed. In the first, eight weaned pigs, aged 24 days were used. In the second,  
21 eight finishing pigs with approximately 5 months, obtained from abattoir were used. The  
22 eight weaned pigs were euthanized using the protocol of association of the intramuscular  
23 injection of 1% acepromazine (0.1 mg / kg) with an intravenous injection of sodium  
24 pentobarbital (40 mg/kg of body weight) and subsequent application of potassium  
25 chloride 19.1% (2 mL / kg) until cardiac arrest. The institutional Ethics Committee for  
26 Animal Experimentation approved all animal procedures (number 11361.2014.30).

27 The kidneys of the piglets were obtained through aseptic technique of celiotomy and  
28 nephrectomy, performed after the euthanasia procedure, being immediately conditioned  
29 in a tray containing refrigerated phosphate-saline buffer solution (PBS) and later  
30 transferred to a laminar flow chamber. Finishing pig kidneys were obtained during  
31 slaughter and immediately washed with refrigerated PBS and packed into identified  
32 plastic bags containing refrigerated PBS and deposited in iceboxes for transport. The  
33 slaughterhouses were selected so that the time between pig slaughter and laboratory  
34 processing did not exceed 40 minutes. As soon as they were received in the laboratory,

1 the renal capsule was removed in a laminar flow environment, with sterile utensils and  
2 the kidneys were divided into two to four parts. Each renal fragment was deposited on  
3 petri dish with a thin layer of agar coated with Dulbecco's Modified Eagle Medium  
4 (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) packed in cooling plates.

5 Cortical kidney fragments with diameters of 6 mm were obtained with  
6 biopsy punches and incubated in DMEM supplemented with 0.2 mL/L glutamine and 10  
7 mL/L penicillin/streptomycin. Two explants/well were deposited onto agar-coated 6-well  
8 plates containing culture medium. The explants were incubated at 37°C with orbital  
9 shaking for 4 hours and subsequently fixed in 10% buffered formalin solution for  
10 histological analysis (hematoxylin-eosin staining). Also, explants were sampled and fixed  
11 immediately after euthanasia to compare these explants with the explants submitted to  
12 incubation. For oxidative stress analyzes, two explants per treatment were frozen at -80  
13 °C immediately after incubation. The same sampling was performed for explants non-  
14 incubated at the end of the dissection time.

15 A total of 384 kidney explants were evaluated, 192 explants obtained  
16 from eight young animals and 192 explants from eight finishing pigs. Renal explants were  
17 allocated in pairs in six-well plates, using three replicates for histological evaluation and  
18 one replicate for evaluation of the biochemical and oxidative status of the sample. These  
19 explants were divided in the following groups: control zero hours (C0), control 4 hours  
20 (C4) and the group exposed to gentamicin 10 mM (EG).

#### 21 22 *4.2.2 Biochemical analysis*

23  
24 After two hours and four hours of incubation the plates were removed  
25 from the oven and in a laminar flow hood, 150 µL of the supernatant from each well was  
26 aliquoted and used for quantification of the biomarkers. Creatinine was measured by  
27 colorimetric assay and  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT) through enzymatic activity test of  
28 high sensitivity, in the automatic equipment Dimension Clinical Chemistry System®  
29 (Siemens, Germany) according to the technique standardized with commercial kits  
30 (Siemens, Germany).

31  
32  
33  
34

### 4.2.3 Histological and morphometrical analysis

After histological processing the explants were analyzed and a lesion score was established considering 10 criteria (Table 1). The intensity of each criterion was considered from one (1) for mild alterations, two (2) for moderate and three (3) for severe changes. In addition, a severity factor was also considered varying from 1 (cytoplasmic vacuolization) to 3 (necrosis). The maximum possible total score was 39 (Table 1).

**Table 1.** Establishment of a lesion score: endpoints used to evaluate histological lesions in the kidney.

Tissue	Type of lesions (severity factor)	Maximal score
Kidney	Glomerular atrophy (1)	39
	Presence of protein material in glomerular space (1)	
	Inflammatory infiltrate (1)	
	Congestion (1)	
	Cytoplasmic vacuolization of tubular epithelium (1)	
	Nuclear vacuolization of tubular epithelium (1)	
	Presence of hyaline material into tubular lumen (1)	
	Apoptosis (1)	
	Thickening of glomerular basal membrane (2)	
	Necrosis (3)	

Notes: The score for each lesion was obtained by multiplying the severity factor by the extent of the lesion. Extent of the lesion (intensity or observed frequency): 0 = no lesion, 1 = mild extent, 2 = moderate extent, 3 = severe extent.

Glomerular morphometry was obtained by calculating the areas of glomerular tuft, glomerulus and Bowman space using a software image analysis system (Motic 2.0, Richmond, Canada) in a 20x magnification. The areas of eight glomeruli per fragment were measured, disregarding the glomeruli from the periphery of the fragment.

### 4.2.4 Oxidative stress biomarkers

The technique of evaluation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels was used as indicators of stress oxidative and lipid peroxidation whereas

1 the antioxidant capacity was evaluated through the reduced glutathione (GSH), 2, 2'-  
2 azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) assay (ABTS) and ferric reducing  
3 antioxidant power assay (FRAP). The frozen explants were homogenized using Tissue  
4 tearor (Bjospec, São Paulo, SP, Brazil) in cold EDTA buffer (0.02 M) resulting in  
5 homogenates used in the assays.

6 The lipid peroxidation of the kidney explants was assessed by  
7 determining TBARS levels, using an adapted method described by Guedes et al. (2006).  
8 For this assay, trichloroacetic acid (10%) was added to the homogenate to precipitate  
9 proteins, followed by centrifugation ( $1000 \times g$ , 3 min, 4 °C). The protein-free supernatant  
10 was separated and mixed with thiobarbituric acid (0.67%). The mixture was kept in a  
11 water bath (15 min, 100 °C). Malondialdehyde (MDA), an intermediate product of lipid  
12 peroxidation, was determined by the difference between absorbance at 535 and 572 nm  
13 using a microplate spectrophotometer reader. The results were presented as TBARS  
14 (nmol MDA/mg of tissue).

15 The determination of GSH levels was obtained through a technique  
16 described and adapted by (SEDLAK; LINDSAY, 1968). The samples were treated with  
17 50% trichloroacetic acid (50% w/v) and centrifuged ( $1500 \times g$  for 15 min), and the  
18 supernatant was mixed with 0.4M Tris-HCl solution (pH 8.9) and 10 mM  
19 dithiobisnitrobenzoic acid. Posteriorly, the homogenate stayed for 5 min before being  
20 read at 412 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa,  
21 Finland). Starting from different concentrations of GSH a standard curve was obtained,  
22 so the results were expressed as nmol GSH / mg of kidney tissue.

23 Antioxidant capacity assays are based on the reduction of cations  
24 present in the sample in previously known amounts in the ABTS test using the 2,2'-  
25 azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) ( $ABTS^+$ ) and FRAP is based on the  
26 production of the  $Fe^{2+}$  ion (ferrous form) from the  $Fe^{3+}$  ion reduction (ferric form). The  
27 frozen kidney samples collected were homogenized in ice-cold 1.15% KCl buffer  
28 solution. Samples were centrifuged ( $200 \times g$  for 10 min at 4 °C) and the supernatants were  
29 used in both assays (ABTS and FRAP), according to Katalinic et al., (2005). The diluted  
30 ABTS solution (200  $\mu$ L) was mixed with 10  $\mu$ L of sample in each well. After 6 min of  
31 incubation at 25 °C, the absorbance was measured at 730 nm (Multiskan GO Microplate  
32 Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finland). For the FRAP assay, the  
33 supernatants (10  $\mu$ L) were mixed with the prepared FRAP reagent (150  $\mu$ L). The reaction  
34 mixture was incubated at 37 °C for 30 min, and the absorbance was measured at 595 nm.

1 The results from ABTS and FRAP assays were equated using a standard Trolox curve  
2 (0.02–20 nmol). Considering these are Trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC)  
3 assays, results were presented as  $\mu\text{mol}$  Trolox-equivalent/mg of tissue.

#### 4 5 *4.2.5 Statistical analysis*

6  
7 Data are presented as means with their SEM (standard error of the  
8 mean). The results were analyzed with the free software Rstudio Team (2016). For  
9 creatinine concentration and gamma-glutamyltransferase activity, a model for a  $2 \times 2 \times 2$   
10 factorial design was applied. Further differences between treatments were determined by  
11 student's *t* test. Data from lesional score, morphometry and oxidative stress were  
12 evaluated using a factorial analysis of variance ( $3 \times 2$ ) followed by Tukey's test.  
13 Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ .

### 14 15 **4.3 Results and Discussion**

#### 16 17 *4.3.1 Biochemical analysis*

18  
19 To evaluate the integrity of renal tissue the levels of creatinine and GGT  
20 activity were measured. We are also interested in comparing the response to gentamicin  
21 exposure in the different ages (piglets and finishing pigs) and through the time (2 and 4  
22 hours). To achieve this, a factorial design analysis was performed, considering the three  
23 factors (time of incubation, age and treatment). An interactive effect was observed  
24 between the treatment and age in the concentration of creatinine ( $p < 0.001$ ) and GGT  
25 activity ( $p < 0.007$ ) only in finishing pigs. In addition, in this group, after 2 and 4 hours of  
26 incubation a significant increase in creatinine concentration (76.5%;  $p < 0.0001$ , 73.9%;  
27  $p < 0.0001$ ) and GGT activity (42.87%;  $p = 0.001$ , 30.75%;  $p = 0.001$ ) was observed in  
28 explants exposed to gentamicin when compared to control samples, respectively (Figure  
29 1).

30 The increase in blood urea nitrogen (BUN) and the decrease in  
31 creatinine clearance, both glomerular function markers, are common to patient treated  
32 with gentamicin (MALDONADO et al., 2003). The alteration in glomerular structural  
33 cannot always be related to the gradual loss of glomerular function since glomeruli  
34 structure is normal in gentamicin treated rats which presented an increase in the BUN and

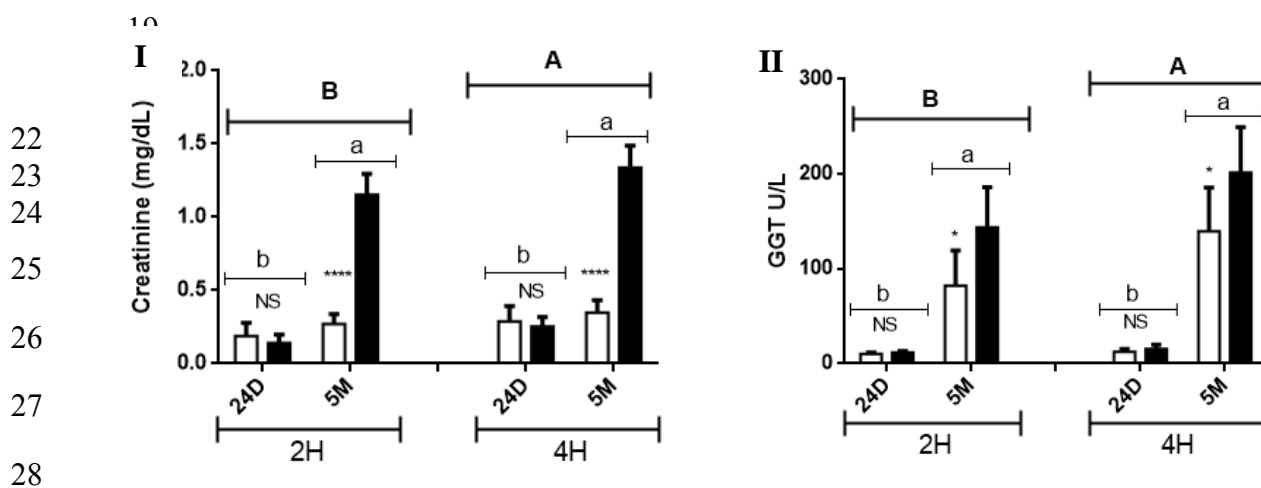
1 serum creatinine (PEDRAZA-CHAVERRÍ et al., 2000). This result was repeated in the  
 2 kidney explant model since observed increased concentration creatinine in incubation  
 3 medium and maintenance of the glomerular structural.

4 The reduction in glomerular filtration rate (GFR), even without a  
 5 change in glomerular morphometry, occurs as a result of the increase of superoxide anions  
 6 and the decrease of superoxide dismutase activity and nitric oxide level as a result of  
 7 using of gentamicin allowing the action of vasoconstricting substances inducing  
 8 mesangial cells contraction, altering the filtration surface area and modifying the  
 9 ultrafiltration coefficient (DUQUE et al., 1992; MARTÍNEZ-SALGADO et al., 2002).

10 Considering that only in finishing pigs we could observe significant  
 11 differences in the biomarkers levels between treatment groups, these results indicate that  
 12 explants from this age are more suitable for toxicological assays than tissues from piglets.

13 A significant effect of the three individual factors was observed in  
 14 creatinine concentration ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0001$ ) and in gamma-glutamyl  
 15 transferase (GGT) activity ( $p = 0.004$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0004$ ). However, no interactive  
 16 effect among the three factors was observed in creatinine concentration ( $p = 0.46$ ) and  
 17 GGT activity ( $p = 0.98$ ).

18



29 **Figure 1** –Biochemical results of renal explants of pigs exposed to different treatments. Creatinine  
 30 concentration (mg/dL) in the culture supernatant (I) and gamma-glutamyl transferase (GGT) activity (U/L)  
 31 in the culture supernatant (II) of renal explants from 24 days old and 5 months old pigs exposed to control  
 32 (□) and gentamicin (■) treatments.

33 A, B different capital letter indicate statistical significance between the time de incubation independently of  
 34 age and treatment by factorial ANOVA (2x2x2)  $P < 0.001$

35 a, b different lower case letter indicate statistical significance between the age independently of the time of  
 36 exposure by factorial ANOVA (2x2x2)  $P < 0.0001$

37 \* indicate statistical significance between treatments within of the same age independently of the time  
 38 exposure. NS: non statistical significant between the treatments.  $P_{\text{Treat}} < 0,0001$ ;  $P_{\text{Age}} < 0,0001$ ;  $P_{\text{Time}} <$   
 39  $0,0001$ ;  $P_{\text{Treat*Age}} < 0,001$ ;  $P_{\text{Treat*Age*Time}} = 0,457$

1  
2 Different urinary enzymes can be used to evaluate nephrotoxicity, but  
3 two of the more commonly used enzymes include  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT) and N-  
4 acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) (CLEMO, 1998). Previous studies reported that the  
5 elevation of GGT was superior and occurred earlier than blood urea, serum creatinine,  
6 creatinine clearance and urine protein excretion, in the detection of gentamicin-induced  
7 acute tubular necrosis (RIVERS et al., 1996; CLEMO, 1998; MELCHERT et al., 2007).  
8 In the present study, both kidney biomarkers increased similarly over time, probably a  
9 consequence of the high dose of gentamicin used, resulting in diffuse necrosis.

#### 10 11 *4.3.2 Histological and morphometrical analysis*

12  
13 One of the aims of this study was to evaluate the morphological  
14 integrity of the observed kidney tissue after 4 hours of incubation comparing with a non-  
15 incubated tissue. The histological findings in C4 group remained similar to C0 group,  
16 showing a preserved tubular epithelium in piglets (Figure 2A and B) and finishing pigs  
17 (Figure 2 D and E). Conversely, explants exposed to gentamicin presented epithelial  
18 cytoplasmic vacuolization and tubular necrosis (Figure 2 C and F) in both ages. A  
19 significant increase (3-fold) in the lesion score was verified in the EG group, in both ages,  
20 when compared to C4 group, whereas no difference was observed between C4 and C0  
21 (Table 2). No interactive effect in the lesion score was verified between age and treatment  
22 ( $p=0.15$ ).

23 The results of the glomerular morphometry were shown in Table 2. As  
24 expected, in finishing pigs the areas were greater than in piglets. No difference was  
25 observed in the glomerular and tuft area between the treatments in both ages, however a  
26 significant increase (1.1-fold) in the Bowman space area was verified in explants from  
27 finishing pigs exposed to gentamicin. Similarly, a previous study about the toxic effects  
28 of cisplatin in rats, showed no evidence in the glomerular and tuft area, but a significant  
29 increase of Bowman's space (RIBEIRO et al., 2017). This increase is probably related to  
30 a rise in the protein content in the Bowman space leading to an enlarged space.

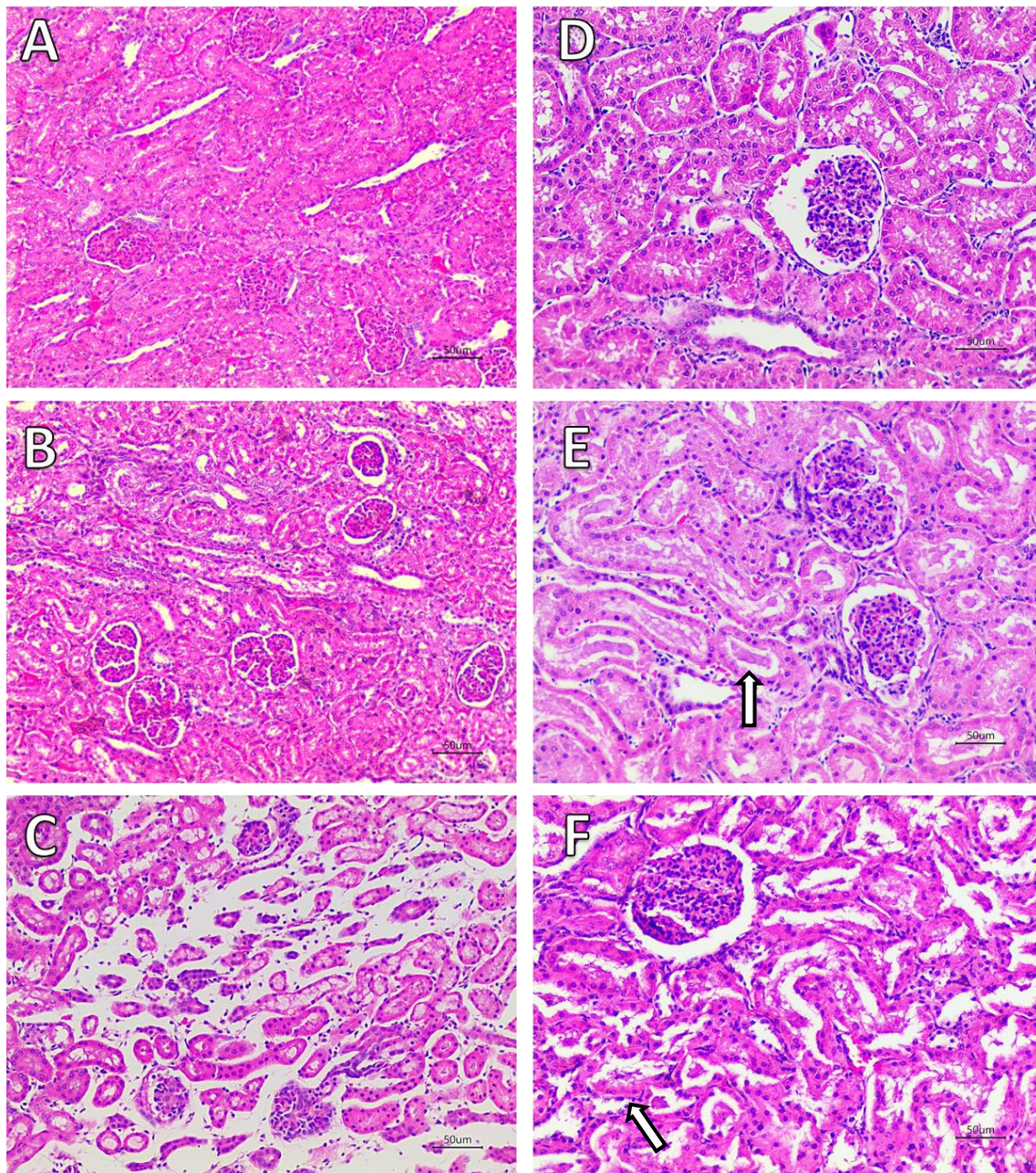
31 The histological assay was two aims, the first one to compare the non-  
32 incubated explants with the control explants to evaluate if the tissue culture will maintain  
33 the histological integrity; and a second one to evaluate whether the explant model could

1 demonstrate kidney toxicity. Our results indicate that the renal explants are a suitable  
2 model to evaluate nephrotoxicity. Similarly, to previous results obtained by our group  
3 using other tissues (intestine, ovaries), the period of incubation did not affect significantly  
4 the tissue morphology (DA SILVA et al., 2019, GEREZ et al., 2017). In addition, the  
5 exposure to the toxic agent was able to induce detectable microscopical changes in both  
6 tested ages.

**Table 2.** Morphology and morphometry of uncultured (0 hour – C0), incubated for 4 hours (C4) renal explants and exposed to gentamicin (EG) from pigs with 24 days and 5 months old.

Item	Piglets (24 days)			Finishing pigs (5 months)			Piglets + finishing pigs			P-value		
	C0	C4	EG	C0	C4	EG	C0	C4	EG	Treat	Age	Treat*Age
<b>Lesional score (A.U.)</b>	1.38± 0.37	2.33± 0.33	7.37± 0.68	0.92± 0.33	1.54± 0.55	5.00± 0.72	1.15± 0.23b	1.94± 0.39b	6.19± 1.18a	<0.001	0.003	0.15
<b>Glomerular area (µm<sup>2</sup>)</b>	3955.36± 323.37	3902.28± 175.89	3904.44± 641.59	14775.99 ±797.91	14795.26 ±992.04	15871.83 ±641.59	9365.67± 5410a	9348.77± 5446a	9888.14± 5984a	0.75	<0.0001	0.73
<b>Tuft area (µm<sup>2</sup>)</b>	2578.92± 225.64	2455.74± 114.36	2538.96± 163.92	9907.99± 509.87	9702.83± 500.45	9216.22± 470.71	6243.45± 3665a	6079.29± 3624a	5877.59± 3339a	0.74	<0.0001	0.75
<b>Bowman space area (µm<sup>2</sup>)</b>	1378.74± 145.54A	1446.53± 104.94A	1365.48± 104.70A	4866.19± 323.31B	5735.56± 350.64B	6788.45± 292.33A	3122.47± 1744b	3591.05± 2145b	4076.97± 2711a	0.01	<0.0001	0.01

Results are expressed as mean±SEM (means standard error of the mean). Means followed of different capital letter indicate statistical significance between the treatments within of each age levels by Tukey'test ( $p \leq 0.05$ ). Means followed of different lower case letter indicate statistical significance between treatments by Tukey'test ( $p \leq 0.05$ ).



**Figure 2** Histological aspects of pigs kidney explants submitted to different treatments. **A** – Photomicrograph of kidney explant from a piglet showing tubules and intact glomeruli. Control group zero hours (C0). **B** – Photo kidney micrograph showing tubules and intact glomeruli of a recently weaned pig of the control group four hours (C4). **C** - Photo kidney micrograph showing diffuse tubular necrosis of recently weaned pig of the group exposed to gentamicin 10 mM (EG). **D** – Photo kidney micrograph showing intact tubules and glomeruli of finishing pig of the group C0. **E** – Photo kidney micrograph showing intact tubules and glomeruli, with eosinophilic material Inside the tubule (arrow) of finishing pig of the C4. **F**- Photo kidney micrograph showing diffuse tubular necrosis (arrow) of finishing pig of the EG. Hematoxylin-Eosin staining (20X).

### 1 4.3.3 Oxidative stress response

2  
3 The results of oxidative stress response assay are shown in Table 3.  
4 Both the lipid peroxidation as the antioxidant capacity were analyzed in control (0 and 4  
5 hours) and treated kidney explants from piglets and finishing pigs. As in histological  
6 analysis, our aim was to evaluate the effect of incubation and gentamicin exposure on  
7 renal explants. In general, explants exposed only to incubation (C4) and gentamicin  
8 showed similar results. A reduction in the antioxidant capacity was expected after four  
9 hours of incubation when compared to non-incubated tissue (C0), as the explants were  
10 submitted to a relative status of hypoxia. However, it was surprisingly that gentamicin  
11 exposure induced no change in the antioxidant response compared to C4 group, since  
12 renal toxicity by gentamicin was associated to reactive oxygen species generation and  
13 reduction of glutathione levels (MALDONADO et al., 2003). One hypothesis to explain  
14 this difference is that hypoxia also induces an important decrease in the antioxidant  
15 response, making it difficult to differentiate from the toxic injury.

16 Concerning lipid peroxidation, a significant increase in MDA levels  
17 (1.8-fold) was observed in explants submitted to gentamicin when compared to both  
18 control groups in finishing pigs. Previous data using different methodologies have  
19 associated the nephrotoxicity of gentamicin to lipid peroxidation also evidenced in this  
20 study (NAKAJIMA; HISHIDA; KATO, 1994; CUZZOCREA et al., 2002).

21 The model of kidney explant in this standardized study for acute  
22 nephrotoxicity including histological, biochemical and oxidative stress evaluation  
23 showed some limitations, such as the maximum period of incubation for maintenance of  
24 viable tissue. According to Fisher et al. (2001), *ex vivo* models need to be improved and  
25 new culture media formulations may correct the limitations; the addition of heparan  
26 sulfate glycosaminoglycans, for example, resulted in a better performance in renal culture  
27 cells, thus extending the applicability of the model in experimental trials.

28  
29  
30  
31  
32  
33

**Table 3.** Oxidative stress response of uncultured (0 hour – 0h) and incubated for 4 hours (4h) renal explants and exposed to gentamicin (Ge) from pigs with 24 days and 5 months old.

Item	Piglets (24 days)			Finishing pigs (5 months)			Piglets + finishing pigs			P-value		
	C0	C4	EG	C0	C4	EG	C0	C4	EG	Treat <sup>2</sup>	Age	Treat*Age
<b>GSH</b> (nmol/mg tissue)	1.09± 0.08A	0.41± 0.05B	0.43± 0.06B	0.17± 0.08A	0.05± 0.01A	0.02± 0.003A	0.47± 0.20a	0.27± 0.07b	0.25± 0.09b	<0.0001	<0.0001	0.0008
<b>FRAP</b> (nmol Trolox Eq /mg of tissue)	2.49± 0.11	1.67± 0.07	1.76± 0.04	2.14± 0.35	1.98± 0.20	1.84± 0.13	2.28± 0.21a	1.81± 0.10b	1.80± 0.06b	0.03	0.91	0.20
<b>ABTS</b> (nmol Trolox Eq/mg of tissue)	1.82± 0.10	1.63± 0.01	1.69± 0.13	4.01± 0.82	6.24± 1.07	6.40± 2.02	3.14± 0.70	3.68± 0.92	3.03± 0.98	0.33	<0.0001	0.24
<b>TBARS (nmol MDA/mg of tissue)</b>	0.004± 0.001A	0.008± 0.0002A	0.008± 0.001A	0.016± 0.005B	0.016± 0.002B	0.029± 0.004A	0.011± 0.004b	0.011± 0.003b	0.016± 0.004a	0.006	<0.0001	0.04

Results are expressed as mean±SEM (means standard error of the mean). Means within a row and types of treatments according to the ages, followed by different capital letter indicate statistical significance. Tukey's test ( $p \leq 0.0001$ ). Means within a row and type of treatment independently of age followed by different lower case letter indicate statistical significance. Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.4 Conclusion

Based on the histological changes, biochemical biomarkers and oxidative stress status it is concluded that the model was effective in identifying renal injury induced by gentamicin. Although age was not a relevant factor in the lesion score analysis, a different response was observed at different age concerning biochemical, morphometric, and oxidative stress evaluations. Considering these aspects and the facility to collect samples from slaughterhouses, we conclude that explants from finishing pigs were more suitable to be used in nephrotoxicity assays.

#### 4.5 References

- ALI, B. H. et al. Renal and myocardial histopathology and morphometry in rats with adenine - Induced chronic renal failure: Influence of gum acacia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 818–828, 2014.
- BASSO, K. M.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Efeito da idade na viabilidade de explantes intestinais: uma abordagem histológica e ultraestrutural. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 2, p. 21–26, 2015.
- CLEMO, F. A. S. Urinary Enzyme Evaluation of Nephrotoxicity in the Dog. **Toxicologic Pathology**, v. 26, n. 1, p. 29–32, 1998.
- CUZZOCREA, S. et al. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 450, n. 1, p. 67–76, 2002.
- DA SILVA, E. et al. Phytic Acid Decreases Oxidative Stress and Intestinal Lesions Induced by Fumonisin B1 and Deoxynivalenol in Intestinal Explants of Pigs. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 18, 2019.
- DUARTE, F. et al. Priming prevent nephrotoxic acute renal failure through stimulation of antioxidant defense mechanism. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 2, 2016.
- DUQUE, I. et al. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. **American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology**, v. 263, n. 3, p. 466–473, 1992.
- FAUCET-MARQUIS, V. et al. Evidence of a new dechlorinated ochratoxin A derivative formed in opossum kidney cell cultures after pretreatment by modulators of glutathione pathways: Correlation with DNA-adduct formation. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, n. 6, p. 530–542, 2006.
- FISHER, C. E. et al. Erk MAP kinase regulates branching morphogenesis in the developing mouse kidney. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 21, p. 4329–38, 2001.

- 1  
2 FREITAS, G. C.; VEADO, J. C. C.; CARREGARO, A. B. Testes de avaliação de injúria renal  
3 precoce em cães e gatos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 411–426, 2014.  
4  
5 GEREZ, J. R. et al. Theriogenology Deoxynivalenol induces toxic effects in the ovaries of pigs :  
6 An ex vivo approach. **Theriogenology**, v. 90, n. 1, p. 94–100, 2017.  
7  
8 GUEDES, R. P. et al. Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord.  
9 **Neurochemical Research**, v. 31, n. 5, p. 603–609, 2006.  
10  
11 GUPTA, I. R.; LAPOINTE, M.; YU, O. H. Morphogenesis during mouse embryonic kidney  
12 explant culture. **Kidney international**, v. 63, n. 1, p. 365–376, 2003.  
13  
14 HILL, N. R. et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and  
15 Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–18, 2016.  
16  
17 HOHMANN, M. S. N. et al. 5-Lipoxygenase Deficiency Reduces Acetaminophen-Induced  
18 Hepatotoxicity and Lethality. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 1, p. 1–13, 2013.  
19  
20 KATALINIC, V. et al. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by  
21 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant  
22 power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and  
23 Pharmacology**, v. 140, n. 1, p. 47–52, 2005.  
24  
25 KOUADIO, J. et al. Lipid metabolism disorders, lymphocytes cells death, and renal toxicity  
26 induced by very low levels of deoxynivalenol and fumonisin B 1 alone or in combination  
27 following 7 days oral administration to mice . **Toxicology International**, v. 20, n. 3, p. 218,  
28 2013.  
29  
30 LI, H. et al. The Toxic Effects of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 on Kidney through Regulating  
31 L-Proline and Downstream Apoptosis. **Hindawi Biomed Research International**, v. 2018, n.  
32 1, p. 1–11, 2018.  
33  
34 LING, C. H. Y. et al. Bovine meniscal tissue exhibits age- and interleukin-1 dose-dependent  
35 degradation patterns and composition-function relationships. **Journal of Orthopaedic  
36 Research**, v. 34, n. 5, p. 801–811, 2016.  
37  
38 MALDONADO, P. D. et al. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative  
39 stress and renal damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 3, p. 317–324, 2003.  
40  
41 MARTÍNEZ-SALGADO, C. et al. Involvement of reactive oxygen species on gentamicin-  
42 induced mesangial cell activation. **Kidney International**, v. 62, n. 5, p. 1682–1692, 2002.  
43  
44 MELCHERT, A. et al. Gama-Glutamil Transpeptidase Urinária Como Indicador De  
45 Insuficiência Renal Aguda Induzida Por Gentamicina Em Cães. **Arquivos de Ciências  
46 Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 10, n. 2, p. 111–116, 2007.  
47  
48 MELGAÇO, S. S. C. et al. Nefreotoxicidade dos anti-inflamatórios não esteroidais. **Medicina  
49 (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 4, p. 382–390, 2010.  
50

- 1 MENDES, C. A. C.; BURDMANN, E. a. Polimixinas: revisão com ênfase na sua  
2 nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p. 752–759, 2009.
- 3
- 4 NAKAJIMA, T.; HISHIDA, A.; KATO, A. Mechanisms for protective effects of free radical  
5 scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. **The American journal of**  
6 **physiology**, v. 266, n. 3 Pt 2, p. F425-31, 1994.
- 7
- 8 PEDRAZA-CHAVERRI, J. et al. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to  
9 antioxidant enzymes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 7, p. 602–11, 2000.
- 10
- 11 POSTON, J. T.; KOYNER, J. L. Sepsis associated acute kidney injury. **BMJ (Online)**, v. 364,  
12 p. 1–17, 2019.
- 13
- 14 RANDALL, K. J.; TURTON, J.; FOSTER, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue : a  
15 review of methods and applications. **Cell Biology and Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 267–284,  
16 2011.
- 17
- 18 RIBEIRO, R. S. et al. Precocious obesity predisposes the development of more severe  
19 cisplatininduced acute kidney injury in young adult mice. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–17,  
20 2017.
- 21
- 22 RIVERS, B. et al. Evaluation of urine gamma-glutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio as a  
23 diagnostic tool in an experimental model of aminoglycoside-induced acute renal failure in the  
24 dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, n. 4, p. 323–336, 28 jul.  
25 1996.
- 26
- 27 RStudio Team 2016. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. URL  
28 <http://www.rstudio.com/>.
- 29
- 30 SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl  
31 groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1 jan.  
32 1968.
- 33
- 34 SILVA, W.T. et al. Efeito renoprotetor dos flavonoides do vinho na nefrotoxicidade do  
35 imunossupressor Tacrolimus. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 3, p. 388–392, 2011.
- 36
- 37 SODRÉ, F.L.; COSTA, J.C.B.; LIMA, J.C.C. Avaliação da função e da lesão renal : um desafio  
38 laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329–337,  
39 2007.
- 40
- 41 TEJERA, D. et al. Epidemiology of acute kidney injury and chronic kidney disease in the  
42 intensive care unit. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 4, p. 444–452, 2017.
- 43
- 44 WINBANKS, C. E. et al. Explanting Is an Ex Vivo Model of Renal Epithelial-Mesenchymal  
45 Transition. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, n. 1, p. 1–7, 2011.

## 5. ARTIGO B

### ÁCIDO FÍTICO MODULA TOXICIDADE INDUZIDA POR DESOXINIVALENOL EM EXPLANTES RENAI

Weslem Garcia Suhett<sup>1</sup>, Juliana Rubira Gerez<sup>2</sup>, Milton James Jimenez Valdiviezo<sup>3</sup>, Victor Hugo Brunaldi Marutani<sup>3</sup>, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Professor do Departamento de Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina, <sup>2</sup>Professora do Departamento de Histologia da Universidade Estadual de Londrina, <sup>3</sup>Mestrando no programa de Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, <sup>4</sup>Professora do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

#### RESUMO

Os rins têm dentre as suas funções a excreção e biotransformação, e portanto estão expostos constantemente aos efeitos de substâncias nefrotóxicas como as micotoxinas. A toxicidade renal pode resultar em doenças graves e irreversíveis, portanto a busca por substâncias com potencial renoprotetor é desejável. O ácido fítico (IP6) apresenta propriedades antioxidantes, no entanto seu efeito sobre o rim não é conhecido. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do ácido fítico, sobre explantes renais expostos ao desoxinivalenol. Para este propósito, avaliaram-se explantes renais de suínos com 24 dias de vida que foram submetidos aos seguintes tratamentos: controle (CTRL), ácido fítico 5  $\mu$ M (AF), desoxinivalenol 10  $\mu$ M (EDON) e desoxinivalenol 10  $\mu$ M acrescido de ácido fítico 5  $\mu$ M (EDONAF). Os explantes foram incubados durante 4 horas e posteriormente processados para análise histológica e obtenção de escore de lesão baseado em 10 critérios. No sobrenadante do meio de cultura, os biomarcadores de gama-glutamilttransferase (GGT) e creatinina foram quantificados. Para avaliar a resposta ao estresse oxidativo foram utilizados os métodos de análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), poder de redução do ferro (FRAP), poder de redução do 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e a quantificação da glutathiona reduzida (GSH). Na avaliação histológica observou-se aumento significativo no escore de lesão no grupo EDON (4,57 $\pm$ 0,5) em comparação ao controle (2,0 $\pm$ 0,45) e EDONAF (2,42 $\pm$ 0,52). Uma melhora na capacidade antioxidante da amostra foi observada quando comparada os grupos AF e CTRL nos testes ABTS e FRAP, bem como efeito protetor do IP6 frente a exposição de desoxinivalenol, sendo que os níveis de GSH mantiveram-se superiores no grupo EDONAF em relação ao grupo EDON. Observou-se aumento significativo na atividade de GGT no grupo EDON (8,67 $\pm$ 0,69 UI/L) em relação ao demais tratamentos. Os resultados indicam que o IP6 diminuiu os efeitos tóxicos induzidos pelo DON e tem potencial como substância renoprotetora.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo. Antioxidante. Renoproteção. Nefropatias. Explantes.

## 1 ABSTRACT

2  
3  
4 The kidneys have among their functions excretion and biotransformation, and therefore are  
5 constantly exposed to the effects of nephrotoxic substances such as mycotoxins. Renal toxicity  
6 can result in serious and irreversible disease, so the search for substances with potential  
7 renoprotective is desirable. Phytic acid (IP6) has antioxidant properties, however its effect on  
8 the kidney is not known. The objective of this study was to evaluate the effects of phytic acid  
9 on kidney explants exposed to deoxynivalenol. For this purpose, 24-day-old swine kidney  
10 explants were evaluated and subjected to the following treatments: control (CTRL), 5  $\mu$ M  
11 phytic acid (AF), 10  $\mu$ M deoxynivalenol (EDON) and 10  $\mu$ M deoxynivalenol plus phytic acid.  
12 5  $\mu$ M (EDONAF). The explants were incubated for 4 hours and further processed for  
13 histological analysis and to obtain injury score based on 10 criteria. In the culture medium  
14 supernatant, the gamma glutamyltransferase (GGT) and creatinine biomarkers were quantified.  
15 To evaluate the response to oxidative stress the method of analysis of thiobarbituric acid  
16 reactive substances (TBARS), the ferric reducing power ability (FRAP), 2,2'-azino-bis(3-  
17 ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) reducing power (ABTS) and the quantification of  
18 reduced glutathione (GSH) been used. Histological evaluation showed a significant increase in  
19 the lesion score in the EDON group ( $4.57 \pm 0.5$ ) compared to the control group ( $2.0 \pm 0.45$ ) and  
20 EDONAF ( $2.42 \pm 0.52$ ). An improvement in the antioxidant capacity of the sample was  
21 observed when comparing the AF and CTRL groups in the ABTS and FRAP tests, as well as  
22 the protective effect of IP6 against deoxynivalenol exposure. GSH levels remained higher in  
23 the EDONAF group than EDON group. There was a significant increase in GGT activity in the  
24 EDON group ( $8.67 \pm 0.69$  IU/L) compared to the other treatments. The results indicate that IP6  
25 decreased the DON-induced toxic effects and has potential as a renoprotective substance.

26  
27 **Key words:** Oxidative stress. Antioxidant. Renoprotection. Nephropathy. Explants

## 5.1 Introdução

O ácido fítico é uma substância encontrada na maioria dos cereais, sementes oleaginosas e legumes, constituindo cerca de 1-5% do peso e 60-90% de fósforo total (GRAF; EATON, 1990). Pela ação de fitases endógenas durante a estocagem, fermentação, germinação, processamento e digestão dos grãos e sementes, o ácido fítico pode ser parcialmente desfosforilado e produzir compostos penta-fosfato (IP<sup>5</sup>), tetra-fosfato (IP<sup>4</sup>) e tri-fosfato (IP<sup>3</sup>). Porém, estudos *in vitro* indicam que somente IP<sup>5</sup> e IP<sup>6</sup> tem alta capacidade de se ligar em minerais, desenvolvendo assim uma capacidade antioxidante (SANDBERG; CARLSSON; SVANBERG, 1989).

A sua ação antioxidante provém da alta capacidade de quelar o ferro, preservando sua solubilidade ao mesmo tempo em que o torna não reativo, pois as reações catalisadas pelo ferro causam danos oxidativos ao organismo. O ácido fítico altera o potencial redox do ferro, mantendo-o em sua forma férrica (Fe<sup>3+</sup>), pois sua forma ferrosa (Fe<sup>2+</sup>) promove a produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica, enquanto que o Fe<sup>3+</sup> fica inerte (GRAF; EMPSON; EATON, 1987).

Estudos associam o ácido fítico com a supressão da carcinogênese do cólon (JARIWALLA *et al.*, 1988; GRAF; EATON, 1990), redução da incidência de cálculos renais (OHKAWA *et al.*, 1984) e proteção contra lesões de isquemia e reperfusão miocárdica (KO; GODIN, 1991) em decorrência a sua atividade antioxidante.

O estresse oxidativo pode ser definido como um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERNS) associado a uma baixa atividade dos sistemas antioxidantes, levando a uma lesão celular ou tecidual (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O aumento de estresse oxidativo está presente em condições fisiológicas, como o envelhecimento e a prática de exercícios, assim como em doenças como câncer, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, diabetes, inflamações e intoxicações (PREISER, 2012).

Entretanto, as células possuem um sistema de defesa para atuar sobre os EROS, podendo agir de dois modos, como detoxificadora do agente oxidante, antes que a lesão seja gerada, sendo executada via pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalases, glutathiona-peroxidase (GPx) e vitamina E ou ainda pode atuar como reparadora da lesão já ocorrida, ação essa desempenhada pelo ácido ascórbico, glutathiona-redutase (GSR) e pela GPx (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

1 Quando esses mecanismos de proteção e reparo se tornam deficientes  
2 diversos tecidos podem sofrer lesão, e os mais afetados são aqueles de alta taxa  
3 metabólica como os rins. Há várias afecções que induzem o estresse oxidativo nos rins,  
4 dentre elas a hipertensão arterial, diabetes mellitus, síndrome metabólica, hiperlipidemia,  
5 infecções, uso de alguns antibióticos, toxinas e radiação (OZBEK, 2012).

6 Entre as toxinas associadas à lesão renal estão as micotoxinas, que são  
7 metabólitos secundários de fungos. Entre as mais de 300 micotoxinas já conhecidas, as  
8 com provável ação nefrotóxica são a ocratoxina A, citrinina (KROGH e ELLING, 1977)  
9 e os derivados de tricotecenos, em especial o desoxinivalenol (DON) (ABRUNHOSA *et*  
10 *al.*, 2012; RUIZ *et al.*, 2011). A toxicidade de uma micotoxina é dependente de aspectos  
11 como quantidade ingerida, tempo de exposição e sinergia entre as diferentes micotoxinas  
12 (BULLERMAN, 2000).

13 O desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina do grupo dos tricotecenos  
14 que promove grande impacto econômico e risco à saúde humana e animal (PETSKA,  
15 2010; DILKIN e MALLMAM, 2011). Aproximadamente 25% dos alimentos cultivados  
16 mundialmente estão contaminados por micotoxinas e, entre os cereais, o desoxinivalenol  
17 é uma das micotoxinas mais frequentes (KÖNIGS *et al.*, 2007).

18 O DON interfere diretamente na síntese proteica e conseqüentemente  
19 na vias sinalizadoras por *mitogen activated protein kinases* (MAPK) e portanto, tem  
20 relação direta com a resposta inflamatória e morte celular, atuando por interação química  
21 em diversas vias, como TNF- $\alpha$ , interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6)  
22 (IORDANOV *et al.*, 1997; AOIADI *et al.*, 2006; WAGNER; NEBREDA, 2009).  
23 Indiretamente, em decorrência da ativação das MAPK, outra via de lesão associado ao  
24 desoxinivalenol é a produção de EROS e, conseqüentemente, desencadeando a  
25 peroxidação lipídica (RIZZO *et al.*, 1994).

26 O DON induziu o aumento na produção de espécies reativas de  
27 oxigênio em diferentes modelos *in vitro*, como em células U937, uma linhagem de  
28 monócitos humanos nas concentrações de 80 e 160  $\mu$ M de DON durante oito horas  
29 (COSTA *et al.*, 2009; MISHRA *et al.*, 2014), células clone 9 do fígado de ratos em  
30 concentrações de 0,1 $\mu$ g/ml por 48 horas e dose única de 40 $\mu$ M de DON em células A2780  
31 oriundas de carcinoma ovariano (MISHRA *et al.*, 2014).

32 DON estimula maior síntese de IgA, estando relacionado a  
33 glomerulonefrites por deposição dessa imunoglobulina nas células mesangiais do  
34 corpúsculo renal (DONG; PESTKA, 1993; DONG; SELL; PESTKA, 1991). Essa

1 alteração foi observada em camundongos alimentados com 2, 10 e 25 mg/kg,  
2 apresentando aspectos histológicos renais semelhantes a glomerulonefrite humana por  
3 IgA (GREENE; AZCONA-OLIVERA; PESTKA, 1994; PESTKA, 2003).

4 Outra possibilidade de lesão renal frente a exposição ao desoxinivalenol  
5 pode estar associada à morte celular, por apoptose por meio da ativação de caspases. Em  
6 um modelo de cultura de células tubulares renais expostas a 100 µM de DON observou-  
7 se morte de 50% das células em 48 horas de incubação, sendo que uma maior expressão  
8 de caspase-3 foi observada em uma concentração de 50 µM de DON (KÖNIGS *et al.*,  
9 2007).

10 Deste modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade  
11 renoprotetora do ácido fítico por meio de sua capacidade antioxidante frente a exposição  
12 a desoxinivalenol e determinar atividade nefrotóxica do desoxinivalenol por meio de  
13 aspectos histológicos, biomarcadores bioquímicos e o estado oxidativo em um modelo *ex*  
14 *vivo*.

15

## 16 **5.2 Material e Métodos**

17

### 18 5.2.1 Animais

19

20 Foram utilizados 8 leitões com 24 dias, desmamados ao vigésimo  
21 primeiro dia de vida, oriundos de granjas de suínos da região de Londrina-Paraná, em  
22 bom estado clínico, sendo considerados saudáveis. Ambos foram eutanasiados utilizando  
23 o protocolo de associação de acepromazina 1% (0,1mg/Kg) com pentobarbital sódico (6  
24 mg/kg) e subsequente aplicação da solução de Cloreto de Potássio 19,1% (2 mL/Kg). O  
25 Comitê de Ética Institucional para Experimentação Animal aprovou todos os  
26 procedimentos em animais (número 11361.2014.30).

27

### 28 5.2.2 Modelo experimental *ex vivo*

29

30 Após a eutanásia, os suínos foram submetidos à celiotomia de forma a  
31 acessar os rins e retirá-los da cavidade abdominal, sendo imediatamente acondicionados  
32 em bandeja contendo solução fisiológica (NaCl 0,9%) refrigerada. No ambiente do fluxo  
33 laminar, com auxílio de punch de 6 mm, obteve-se os fragmentos de rins (explante), que

1 foram depositados em placas de 6 poços contendo um de 1 mL de ágar-ágar sobreposta  
2 por 6 mL da solução teste de acordo com cada grupo.

3 Um total de 192 explantes renais foram avaliados, e alocados em 4  
4 grupos: controle (CTRL), grupo exposto ao ácido fítico 5 mM (AF), grupo exposto ao  
5 desoxinivalenol 10  $\mu$ M (EDON) e grupo exposto ao ácido fítico 5 mM mais  
6 desoxinivalenol 10  $\mu$ M (EDONAF).

7 Em todos os tratamentos, o Meio de Eagle Modificado por Dulbecco®  
8 (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, EUA) suplementado com glutamina 0,2 mL/L,  
9 penicilina/estreptomicina 10 mL/L e Soro Fetal Bovino Gibco® (Thermo Fisher  
10 Scientific, EUA) foi utilizado como base de cultura de incubação, sendo a composição do  
11 grupo CTRL. Para o grupo AF, ao meio DMEM foi acrescentado ácido fítico de arroz  
12 diluído em solução a 100 mM de forma a obter uma solução com concentração de 5 mM;  
13 para o grupo EDON foi acrescentado desoxinivalenol na quantidade suficiente para  
14 atingir a concentração de 10  $\mu$ M e para o grupo EDONAF foi acrescentado ácido fítico de  
15 arroz diluído em solução a 100 mM e desoxinivalenol na quantidade suficiente para  
16 atingir as concentrações respectivamente de 5 mM e 10  $\mu$ M.

17 Os explantes foram incubados aos pares, a 37°C, com agitação orbital  
18 durante 4 horas. Após o período de incubação, quatro explantes de cada tratamento foram  
19 fixados em formalina tamponada a 10% para processamento histológico (coloração com  
20 hematoxilina-eosina), outros dois explantes foram congelados em freezer à -80 °C para  
21 posterior análise de estresse oxidativo.

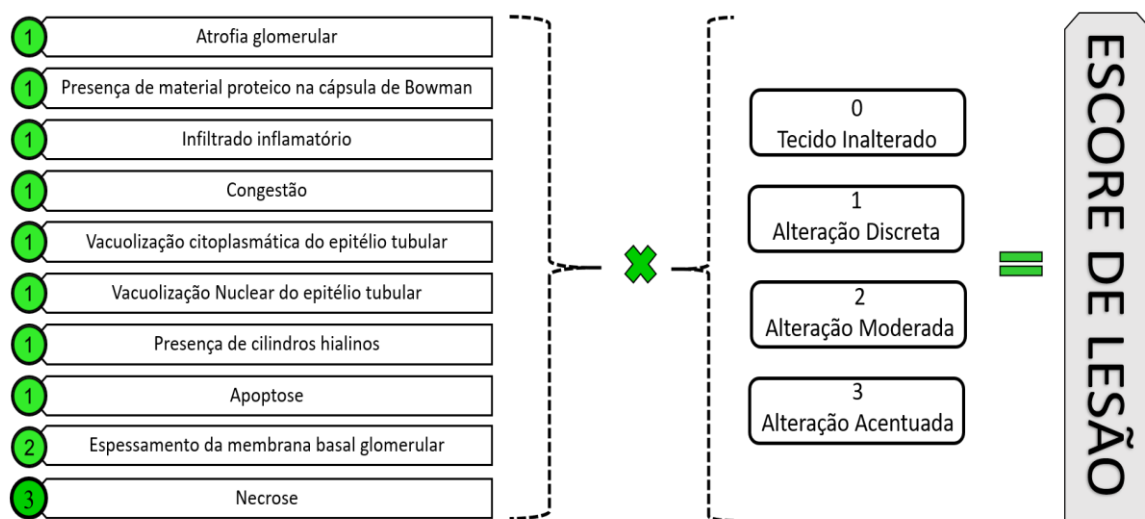
### 22 23 5.2.3 Biomarcadores Renais

24  
25 Do sobrenadante após trinta minutos, uma hora, duas horas, três horas  
26 e quatro horas de incubação, foram aliqüotados em fluxo laminar 150  $\mu$ L utilizados para  
27 quantificar os biomarcadores de lesão renal creatinina por meio de ensaio colorimétrico  
28 e  $\gamma$ -glutamil transferase (GGT) medido por meio de teste de atividade enzimática de alta  
29 sensibilidade, no equipamento automático Dimension Clinical Chemistry System®  
30 (Siemens, Alemanha) de acordo com a técnica padronizada com kits comerciais  
31 Siemens®.

### 32 33 5.2.4 Avaliação Histológica

34

Após o processamento, os fragmentos foram analisados por meio de microscopia de luz em 10 critérios, pontuados de acordo com a gravidade da lesão, em zero (0) para tecidos inalterados, um (1) para alterações discretas, dois (2) para moderados e três (3) para alterações acentuadas. Os critérios avaliados foram: espessamento da membrana basal glomerular, presença de material proteico na cápsula de Bowman, atrofia glomerular, infiltrado inflamatório, congestão, vacuolização citoplasmática ou nuclear do epitélio tubular, presença de cilindros hialinos, apoptose e necrose. Considerou-se ainda um fator de gravidade da lesão que foi multiplicado por cada critério (Figura 1).



**Figura 1:** Diagrama de escore de lesão histológica renal. ● Peso estipulado para cada critério. □ Critérios histológicos de lesão. □ Intensidade da lesão

Através da fórmula de área de uma elipse ( $R \times r \times \pi$ ) obteve-se as áreas de tufo glomerular, glomérulo e espaço de Bowman de oito glomérulos por fragmento descartando as áreas danificadas pelo processo de incubação, para as avaliações morfométricas glomerulares.

### 5.2.5 Estresse Oxidativo

Para a avaliação do estresse oxidativo foi utilizado o teste de avaliação dos níveis de malondialdeído (MDA) por meio da reação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e para avaliar a capacidade antioxidante da amostra foi utilizado

1 os testes de quantificação da glutathiona reduzida (GSH), o ensaio 2,2'-azinobis (3-  
2 etilbenzotiazolino-6-sulfonato) (ABTS) e poder de redução do ferro (FRAP).

3 Para ambos os testes, foi produzido um homogenato a partir das  
4 amostras de explantes renais congelados, triturados com Tissue Tearor® (Bjospes, São  
5 Paulo, SP, Brasil) em tampão EDTA (0,02 M).

6 A peroxidação lipídica dos explantes renais foi avaliada pela  
7 determinação dos níveis de MDA, utilizando um método adaptado descrito por Guedes  
8 et al., (2006). Para precipitar as proteínas, neste ensaio foi adicionado ácido  
9 tricloroacético (10%) ao homogenato seguido de centrifugação (1000xg, 3 min, 4 °C). O  
10 sobrenadante separado do precipitado de proteínas, foi misturado com ácido  
11 tiobarbitúrico (0,67%) e mantido em banho maria (15 min, 100 °C). O malondialdeído  
12 (MDA), um produto intermediário da peroxidação lipídica foi determinado por meio da  
13 diferença entre a absorbância em 535 e 572 nm, utilizando um leitor de espectrofotômetro  
14 de microplacas, com resultados apresentados em (nmol MDA/mg de tecido).

15 A determinação dos níveis de GSH seguiu a técnica descrita e adaptada  
16 (SEDLAK; LINDSAY, 1968). O homogenato foi diluído em oito mL de tampão EDTA  
17 0,02M, seguindo para o ajuste de pH com a adição ácido tricloroacético a 50% e  
18 centrifugadas (1500xg durante 15 min). O sobrenadante obtido foi misturado com solução  
19 Tris-HCl 0,4 M (pH 8,9) e ácido ditiobisnitrobenzóico 10 mM ficando em repouso por 5  
20 minutos antes de ser lido a 412 nm por espectrofotometria (Multiskan GO Microplate  
21 Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finland) de forma a obter uma curva de  
22 GSH.

23 A determinação dos níveis de FRAP foi realizada após a estabilização  
24 em tampão acetato 0,3 mM e misturado com 2,5 mL do reagente cloreto de ferro  
25 hexahidratado mais 2,5 mL de ácido clorídrico. A solução obtida foi diluída em etanol nas  
26 concentrações de 0,4; 0,8; 1 e 1,25 mMol de Trolox. Com a solução padrão trolox  
27 realizou-se a leitura por espectrofotometria para obter a curva de FRAP.

28 A determinação dos níveis de ABTS foi realizada após a estabilização  
29 do homogenato em tampão fosfato, depois foi adicionado 200 µL do reagente ABTS e  
30 500µL de KCl a 1,15%. Da solução formada, coleta-se 10 µL do sobrenadante e  
31 acrescenta-se 40 µL de água ultrapura e realiza-se a leitura por espectrofotometria,  
32 formando a curva de ABTS.

33 Ambas as técnicas baseadas na redução de cátions presentes na amostra  
34 (FRAP e ABTS) seguiram a técnica descrita por Katalinic et al., (2005). A leitura por

1 espectrofotometria (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific,  
2 Vantaa, Finland) utilizou respectivamente a absorvância de 595 nm e 730 nm  
3 (ARNHOLD; HECK, 2014).

4

#### 5 5.2.6 Análise estatística

6

7 Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software  
8 Rstudio Team (2016). Todos os dados foram expressos como média e desvio padrão (DP).  
9 A diferença estatística entre os grupos para a concentração de creatinina e a atividade  $\gamma$ -  
10 glutamiltransferase foi determinada usando uma análise de variância de dois fatores. Para  
11 as demais análises a distribuição normal foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a  
12 homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Após atendidos estes dois  
13 pressupostos, os dados foram submetidos ao teste a análise de variância (ANOVA),  
14 seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, admitindo uma probabilidade  
15 de erro de 5%.

16

### 17 5.3 Resultados e Discussão

18

#### 19 5.3.1 Biomarcadores de lesão renal

20

21 A creatinina foi utilizada como biomarcador de lesão glomerular, no  
22 entanto, no modelo estudado, a concentração média nos grupos DON ( $0,15 \pm 0,015$   
23 mg/dL) e controle ( $0,17 \pm 0,017$  mg/dL) foi semelhante ( $p=0,89$ ). Verificou-se ainda  
24 diminuição significativa na concentração da creatinina ( $p=0,03$ ) no grupo EDONAF  
25 ( $0,11 \pm 0,008$  mg/dL) em relação ao grupo EDON, padrão que se repete quando se compara  
26 o grupo CTRL com grupo AF ( $0,13 \pm 0,013$  mg/dL) com uma redução de 23,52% da  
27 concentração de creatinina (Tabela 1).

28

29 A avaliação da atividade da  $\gamma$ -glutamiltransferase evidenciou uma  
30 lesão tubular renal, induzida pelo desoxinivalenol, que elevou a atividade da GGT em  
31 30,33% e 56,75% respectivamente em relação aos grupos CTRL e AF. Adicionalmente  
32 observa-se que o ácido fítico foi capaz de promover renoproteção, sendo que o grupo  
33 EDONAF ( $5,35 \pm 0,32$  U/L) apresentou redução significativa de 38,29% ( $p=0,005$ ) da  
34 atividade de GGT em relação do grupo EDON ( $8,67 \pm 0,69$  U/L) (Tabela 2). O ácido fítico  
também foi capaz de reduzir a lesão tubular promovida pelo período de incubação em

1 hipóxia tecidual, uma vez que o grupo CTRL ( $6.04 \pm 0.54$  U/L) em comparação ao grupo  
2 AF ( $3.75 \pm 0.57$ ) apresentou atividade de GGT 1,6 vezes superior ( $p = 0,04$ ).

3 Tanto para avaliação da creatinina, quanto para a atividade de  $\gamma$ -  
4 glutamiltransferase não foi observado efeito de interação entre os tempos e os tratamentos  
5 ( $p=0,21$ ;  $p=0,94$ ), assim o efeito tratamento no modelo de explantes renais incubados por  
6 quatro horas independe do tempo.

**Tabela 1.** Concentração de creatinina (mg/dL) no sobrenadante da cultura de explantes renais de suínos expostos aos tratamentos (Trat): Controle (CTRL), ácido fítico 5  $\mu$ M (AF), desoxinivalenol 10  $\mu$ M (EDON) e desoxinivalenol 10  $\mu$ M acrescido de ácido fítico 5  $\mu$ M (EDONAF).

	<b>½ hora</b>	<b>1 hora</b>	<b>2 horas</b>	<b>3 horas</b>	<b>4 horas</b>	<b>Trat</b>	<b>P value</b>		
							<b>Trat</b>	<b>Tempo</b>	<b>Trat*Tempo</b>
<b>CTRL</b>	0.067±0.015	0.080±0.018	0.165±0.028	0.137±0.014	0.287±0.031	0.17±0.017 <sup>a</sup>	0.04	<0.0001	0.21
<b>AF</b>	0.060±0.016	0.069±0.015	0.132±0.020	0.130±0.013	0.193±0.033	0.13±0.013 <sup>bc</sup>			
<b>EDON</b>	0.061±0.016	0.074±0.021	0.173±0.028	0.131±0.014	0.269±0.023	0.15±0.015 <sup>ab</sup>			
<b>EDONAF</b>	0.054±0.019	0.074±0.010	0.109±0.009	0.151±0.017	0.164±0.015	0.11±0.008 <sup>c</sup>			

Valores médios  $\pm$  DP com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna indicando diferenças significativas entre os tratamentos independentemente do tempo por meio do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 2.** Atividade da  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) (U/L) no sobrenadante da cultura de explantes renais de suínos expostos aos tratamentos (Trat): Controle (CTRL), ácido fítico 5  $\mu$ M (AF), desoxinivalenol 10  $\mu$ M (EDON) e desoxinivalenol 10  $\mu$ M acrescido de ácido fítico 5  $\mu$ M (EDONAF).

	<b>½ hora</b>	<b>1 hora</b>	<b>2 horas</b>	<b>3 horas</b>	<b>4 horas</b>	<b>Trat</b>	<b>P value</b>		
							<b>Trat</b>	<b>Tempo</b>	<b>Trat*Tempo</b>
<b>CTRL</b>	4.20±1.47	4.83±1.19	4.81±0.46	6.58±1.48	7.69±0.83	6.04±0.54 <sup>b</sup>	<0.0001	0.27	0.94
<b>AF</b>	3.90±0.84	4.13±1.39	3.44±0.76	5.32±1.79	3.12±1.02	3.75±0.57 <sup>c</sup>			
<b>EDON</b>	7.94±1.42	7.58±1.35	8.53±1.44	8.98±1.50	10.20±2.10	8.67±0.69 <sup>a</sup>			
<b>EDONAF</b>	5.77±1.41	7.27±1.30	8.18±1.37	8.79±1.24	6.07±1.10	5.35±0.32 <sup>b</sup>			

Valores médios  $\pm$  DP com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna indicando diferenças significativas entre os tratamentos independentemente do tempo por meio do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

1 O efeito tóxico de micotoxinas sobre os rins pode ser avaliado por meio de  
2 análises bioquímicas. Estudos que relacionem alterações em biomarcadores bioquímicos de  
3 lesão renal e a exposição a micotoxinas são escassos, principalmente quando relaciona-se a  
4 lesão por DON. Essa relação geralmente é feita a ocratoxina A, já identificada em níveis séricos  
5 elevados (6,96 ng/dL) em humanos e com elevação nas concentrações séricas de creatinina  
6 (PÉREZ DE OBANOS *et al.*, 2001).

7 A elevação da concentração sérica de creatinina foi observada em ratos que  
8 receberam 45µg/Kg/dia de DON na ração durante uma semana, resultados diferentes ao  
9 encontrado em nosso estudo provavelmente associado ao modelo de estudo, tempo de  
10 exposição e outros fatores não controlados *in vivo* (KOUADIO *et al.*, 2013). Ainda, ratos que  
11 receberam a associação de fumonisina e desoxinivalenol (110 µg/kg/dia + 45µg/Kg/dia)  
12 apresentaram além do aumento nos níveis sérico de creatinina, a perda de função renal com  
13 redução da taxa de filtração glomerular (KOUADIO *et al.*, 2013). Por outro lado, nenhuma  
14 alteração nos níveis de creatinina foi evidenciada em leitões que receberam DON (4 mg/kg) por  
15 30 dias (XIAO *et al.*, 2014).

16 Neste estudo, a ação tóxica de DON pode ser evidenciada pelo aumento da  
17 atividade de GGT, de modo similar ao descrito em estudos *in vivo* (DA SILVA MELO *et al.*,  
18 2006; HENNEMANN *et al.*, 1997; MELCHERT *et al.*, 2007) e *in vitro* (Königs *et al.*, 2007). A  
19 necrose tubular aguda leva a um incremento dos níveis séricos de creatinina e ureia de forma  
20 tardia em comparação à atividade enzimática urinária da GGT (RIVERS *et al.*, 1996).  
21 Alterações na atividade de GGT podem ocorrer com até 4 dias de diferença em relação a ureia  
22 e creatinina (MELCHERT *et al.*, 2007). Não é de nosso conhecimento, até o momento, que haja  
23 estudos que utilizem o modelo de explante renal e avaliação de biomarcadores renais no  
24 sobrenadante.

25 Os dados aqui apresentados, em modelos de explantes renais, evidenciaram  
26 que existe relação da exposição ao DON com a ocorrência de lesão tubular, o que não se observa  
27 concernente a lesão glomerular avaliada pela creatinina, provavelmente associado ao curto  
28 período de incubação. Neste estudo, a maior precocidade e sensibilidade de  $\gamma$ -glutamil  
29 transferase em identificar lesão renal induzida por agente tóxico, em comparação a creatinina  
30 não foi demonstrada.

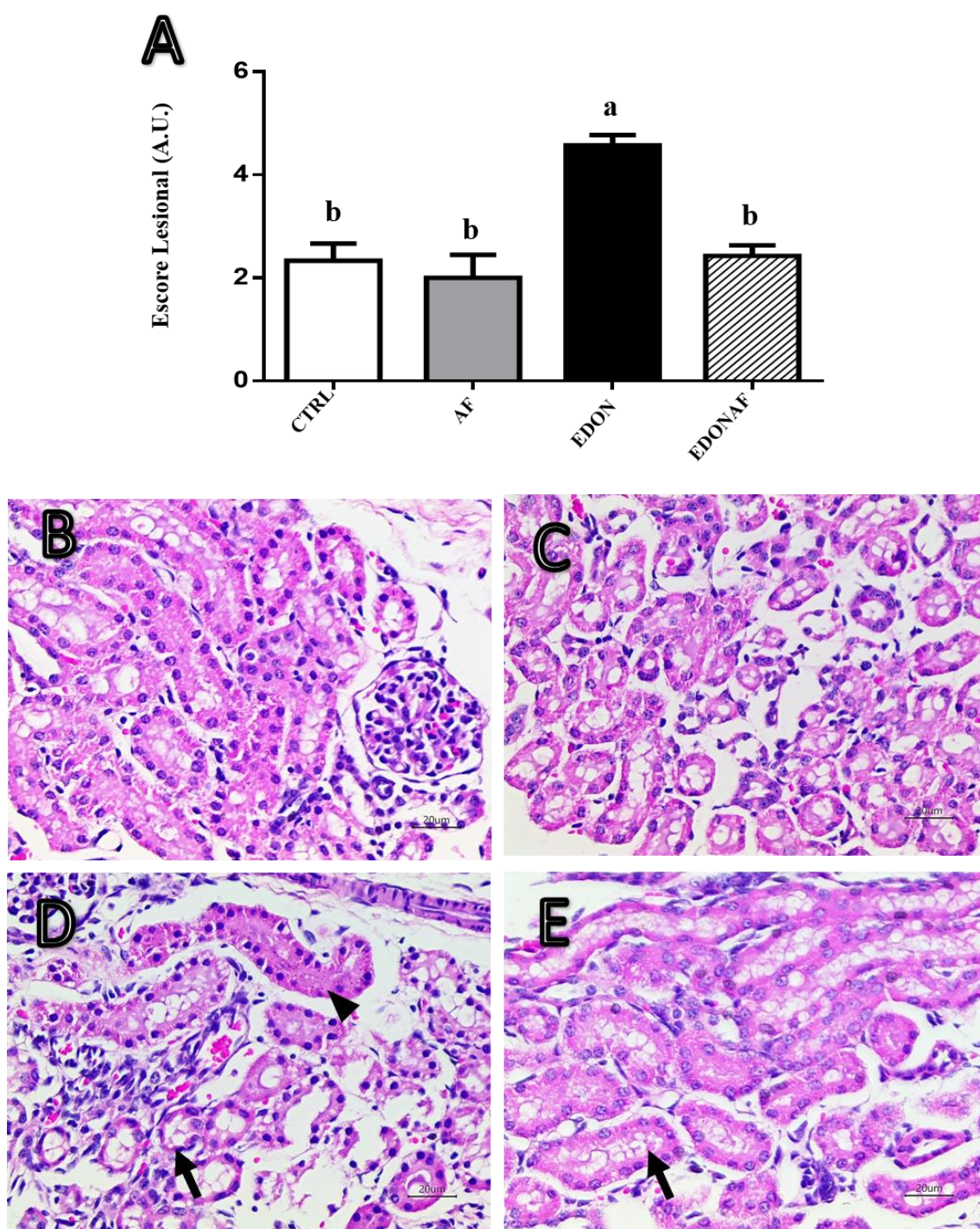
### 32 5.3.2 Histologia e morfologia renal

33

34 Na avaliação do escore de lesão, observou-se que o grupo CTRL, AF e  
35 EDONAF diferiram significativamente do grupo EDON (Figura 2). Observa-se claramente um  
36 aumento de 52,81% e 56,26% no escore de lesão do grupo EDON em relação aos grupos  
37 controle (CTRL) e exposto ao ácido fítico (AF).

38 As alterações histológicas mais comumente observadas foram vacuolização  
39 citoplasmática presente em 90% das amostras, sendo que dentre estes 37% apresentava esta  
40 alteração de forma acentuada; necrose em 68% das amostras, sendo que em 28% dos  
41 fragmentos avaliados ocorria de forma acentuada e apoptose em 13% das amostras expostas ao  
42 DON (Figura 2D). Esses resultados reforçam os achados de Königs et al. (2007) que  
43 relacionaram os efeitos citotóxicos do desoxinivalenol com a indução de morte celular e maior  
44 expressão de caspase 3 em cultura de células epiteliais do túbulo contorcido proximal renal.  
45 Semelhantemente em explantes de jejuno suíno, observou-se como principais alterações  
46 histológicas frente a exposição ao DON a presença de vacuolização citoplasmática e presença  
47 de debris necróticos, associados a uma maior expressão de caspase 3 (DA SILVA *et al.*, 2019).

48 Quando se adiciona o ácido fítico no meio, mesmo na presença de  
49 desoxinivalenol (EDONAF) observa-se que a vacuolização citoplasmática classificada com  
50 acentuada desaparece e a necrose acentuada reduz para 31% dos fragmentos avaliados. Assim  
51 o escore lesional do grupo AF ( $2,0 \pm 0,64$ ) não evidenciou diferenças estatísticas do grupo CTRL  
52 ( $2,33 \pm 1,15$ ) e do grupo EDONAF ( $2,75 \pm 0,5$ ), mas apresenta valores inferiores ao grupo EDON  
53 ( $4,22 \pm 0,64$ ).



54

55 **Figura 2.** Escore de lesão tecidual renal. **A** – Gráfico de escore tecidual renal pelo teste estatístico de Tukey  
 56 ( $p \leq 0,05$ ). **B** – Foto micrografia de explante renal do grupo CTRL com túbulos renais íntegros. **C** - Foto micrografia  
 57 de explante renal do grupo AF com túbulos renais íntegros. **D** - Foto micrografia de explante renal do grupo EDON  
 58 com necrose tubular e presença de material eosinofílico no lúmen tubular (cabeça de seta) e vacuolização  
 59 citoplasmática (seta). **E** - Foto micrografia de explante renal do grupo EDONAF com túbulos renais íntegros e  
 60 vacuolização citoplasmática (seta).

61 \* Letras diferentes para  $p < 0,05$ .

62

63 Diversos fármacos de uso rotineiro na terapia animal e humana, como  
64 antibióticos, anti-inflamatórios, antineoplásicos e medicamentos imunossupressores possuem  
65 como efeito indesejável a nefrotoxicidade. Deste modo, estudos tem buscado agentes com  
66 potencial renoprotetor frente a nefrotoxicidade de fármacos não substituíveis (ALI *et al.*, 2014;  
67 DONADIO *et al.*, 1994; MALDONADO *et al.*, 2003; NAKAJIMA; HISHIDA; KATO, 1994;  
68 SILVA, *et al.*, 2011). Neste sentido, muitos fitofármacos com capacidade antioxidante, como  
69 derivados flavonoides do vinho (SILVA *et al.*, 2011), como a goma de acácia (ALI *et al.*, 2014)  
70 e a cúrcuma (TRUJILLO *et al.*, 2013), tem demonstrado efeitos positivos na redução de lesão  
71 renal. O ácido fítico um fitato utilizado por diversos vegetais como reserva de fósforo, tem  
72 demonstrado importante efeito antioxidante (DA SILVA *et al.*, 2019; GRAF; EMPSON;  
73 EATON, 1987).

74 Neste estudo, os explantes renais tratados com ácido fítico apresentaram  
75 resultados similares ou superiores ao grupo controle. Mediante a avaliação do escore de lesão  
76 tecidual, frente à exposição a agentes nefrotóxicos, o efeito protetor do ácido fítico foi  
77 evidenciado, visto que, quando presente na composição do meio, o escore obtido foi semelhante  
78 ao grupo controle e quando ausente, na presença de DON, ocorria um acréscimo desse escore  
79 de lesão. Semelhante resultado foi obtido em estudo que comparou efeito protetor do IP6 à lesão  
80 tecidual intestinal induzida por micotoxinas, com melhora do escore morfológico das amostras  
81 previamente tratadas com ácido fítico em relação às não tratadas, observando melhor condição  
82 tecidual até em comparação ao grupo controle (DA SILVA *et al.*, 2019).

83 A lesão das células do epitélio tubular renal, evidenciada com vacuolização  
84 citoplasmática, vacuolização nuclear e necrose, presentes após a exposição ao desoxinivalenol,  
85 foram provavelmente induzidas por um aumento na permeabilidade citoplasmática e  
86 mitocondrial ( WAGNER; NEBREDA, 2009; WARGO; EDWARDS, 2014).

87 Em estudo *in vivo*, que avaliou efeito protetor renal da goma de acácia frente  
88 a lesão renal induzida por dietas enriquecida com adenina, demonstram que um agente tóxico  
89 é capaz de modificar a morfologia glomerular (ALI *et al.*, 2014), entretanto tal efeito não foi  
90 observado neste estudo onde o agente nefrotóxico testado era o desoxinivalenol. De acordo com  
91 os autores, um dos principais motivos da melhora das características morfológicas renais  
92 promovido pela goma da acácia, decorre de sua atividade antioxidante, neutralizando radicais  
93 livres indutores de apoptose praticamente suprimida no grupo exposto à adenina acrescido de  
94 goma da acácia. Melhoras nos padrões histológicos também foram observados nesse estudo,  
95 onde explantes exposto ao ácido fítico, mantiveram a arquitetura tecidual durante quatro horas  
96 de incubação mesmo quando desafiadas por um agente nefrotóxico. Segundo Da Silva *et al.*

97 (2019) o ácido fítico foi capaz de reduzir a expressão de caspase 3 em 37,3% de explantes  
 98 intestinais em relação a um grupo controle e indicando que, por meio de sua capacidade  
 99 antioxidante ocorre uma redução de morte celular, o que possivelmente também ocorra no  
 100 epitélio tubular renal.

101 Ao mensurar as áreas glomerulares, do tufo glomerular, do espaço de  
 102 Bowman e da área global do glomérulo não observou-se diferenças estatísticas entre os grupos  
 103 ( $p>0,05$ ), demonstrando que a morfometria glomerular no modelo de explante renal não se  
 104 alterou, mesmo quando expostos ao desoxinivalenol, inferido que no modelo avaliado a  
 105 micotoxina não promoveu lesão glomerular (Tabela 3).

106

107

108 **Tabela 3.** Morfometria glomerular de explantes renais de suínos expostos a diferentes  
 109 tratamentos expresso em áreas de glomérulo, tufo glomerular e espaço de Bowman.

110

Áreas ( $\mu\text{m}^2$ )	CTRL	AF	EDON	EDONAF
<b>Tufo glomerular</b>	2534±92.82a	2593±201.1a	2679±125.5a	2555±215.3a
<b>Glomerular</b>	4001±163.1a	4472±227.5a	4411±273.1a	4058±279.7a
<b>Espaço de Bowman</b>	1466±115.3a	1735±151.8a	1731±214.8a	1502±106.6a

111

112 \* CTRL – Grupo controle incubado em meio DMEM, AF – Grupo incubado em solução de ácido fítico e meio  
 113 DMEM a 5  $\mu\text{M}$ , EDON – Grupo incubado em solução de desoxinivalenol e meio DMEM a 10  $\mu\text{M}$  e EDONAF -  
 114 Grupo incubado em solução de ácido fítico, desoxinivalenol e meio DMEM a 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  respectivamente.

115 \*Letras iguais = sem diferença estatística ( $p>0,05$ ).

116

117

### 118 5.3.3 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante

119

120 O estresse oxidativo, mais precisamente a peroxidação lipídica, foi avaliado  
 121 por meio do teste TBARS. Para avaliação da capacidade antioxidante das amostras utilizou-se  
 122 os testes GSH, ABTS e FRAP (Figura 3). Neste estudo, a exposição dos explantes ao DON não  
 123 induziu diferença significativa nos diferentes parâmetros avaliados em relação ao controle. Já  
 124 a adição de IP6 resultou em aumento significativo nos níveis de ABTS e FRAP em comparação  
 125 ao controle. Ainda, a exposição dos explantes ao DON+IP6 elevou o nível de GSH em relação  
 126 ao grupo EDON, apresentando ainda tendência à redução de TBARS em relação ao grupo DON.

127 Há vários fatores que induzem o estresse oxidativo nos rins, dentre elas a hipertensão, diabetes  
 128 mellitus, síndrome metabólica, hiperlipidemia, infecções, antibióticos, toxinas e radiação  
 129 (OZBEK, 2012).

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

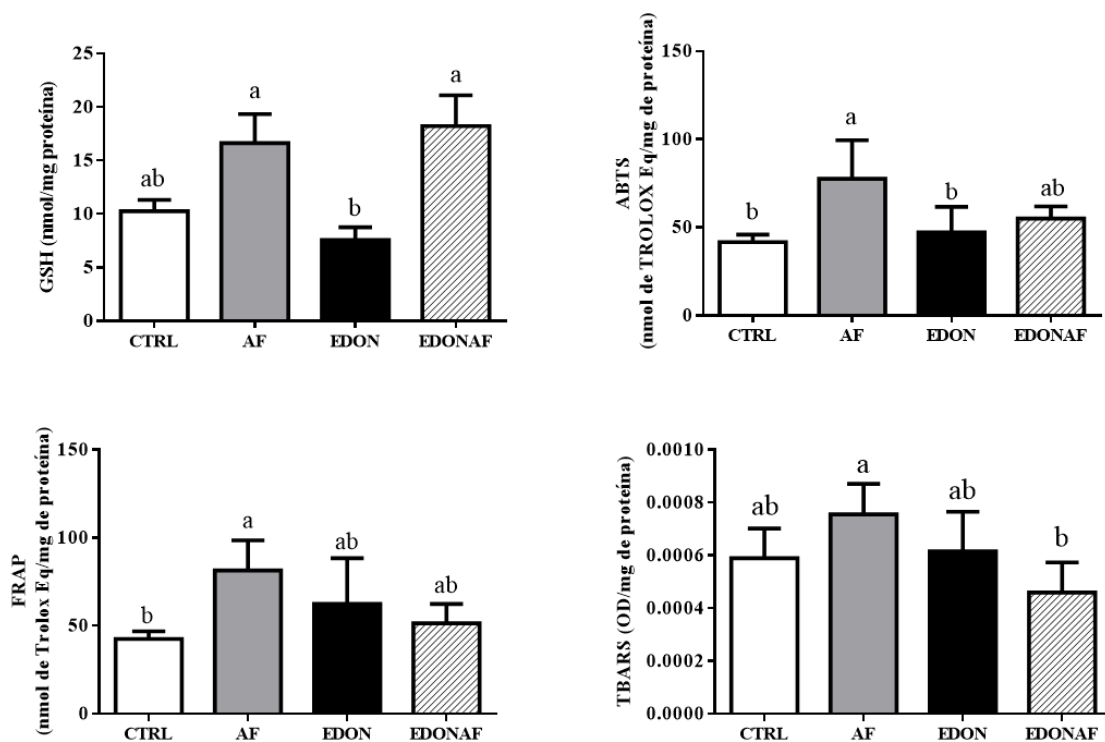
170

171

172

173

174



160 **Figura 3.** Gráficos de avaliação de estresse oxidativo e capacidade antioxidante dos grupos controle (CTRL),  
 161 exposto ao ácido fítico (AF), exposto a desoxinivalenol (EDON) e exposto ao desoxinivalenol mais ácido fítico  
 162 (EDONAF). **A.** Gráfico do teste de quantificação da glutationa reduzida (GSH) expresso em nmol/mg de proteína,  
 163 **B.** Gráfico do ensaio 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato) (ABTS) expresso em nmol de trolox/mg de  
 164 proteína, **C.** Gráfico do teste do poder de redução do ferro (FRAP) expresso em nmol de trolox/mg de proteína e  
 165 **D.** Gráfico do teste de avaliação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresso  
 166 OD/mg de proteína.

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

Aumento nos níveis de MDA e diminuição de GSH foi constatado no fígado de ratos alimentados com ração contaminada com DON e deficiente em vitaminas C, E e selênio. No entanto, esses efeitos deletérios foram controlados com a suplementação desses antioxidantes, indicando que o estresse oxidativo influencia na toxicidade do DON (RIZZO *et al.*, 1994). No presente estudo, não se constatou peroxidação lipídica significativa no grupo DON; entretanto, de modo similar ao descrito por Rizzo *et al.* (1994) constatou-se que nos

175 explantes renais a adição de IP6 aumentou os níveis de GSH em relação ao grupo DON. A  
176 peroxidação lipídica apresentou resultados variáveis em frangos expostos ao DON. No plasma,  
177 coração e rim não houve diferença em relação ao controle, no entanto o intestino apresentou  
178 aumento significativo (AWAD *et al.*, 2014). Deste modo, pode-se supor que no rim o DON  
179 atue principalmente interferindo na capacidade antioxidante e não na peroxidação lipídica.

180                   Outro resultado interessante foi o aumento significativo nos níveis de ABTS  
181 e FRAP do grupo AF em relação ao controle, indicando um potencial benéfico da substância na  
182 preservação da integridade tecidual por meio da sua atividade antioxidante. Resultados  
183 semelhantes foram descritos em estudo prévio que utilizou explantes de intestino tratados com  
184 ácido fítico (DA SILVA *et al.*, 2019).

185                   Apesar de resultados promissores dos estudos recentes quanto ao estresse  
186 oxidativo, seus mecanismos de lesões e o efeito de substâncias antioxidantes no controle do  
187 mesmo, análises críticas e criteriosas devem ser feitas, pois a avaliação do estado oxidativo  
188 apresenta limitações como a resposta individual (HOHMANN *et al.*, 2013; OZBEK, 2012). O  
189 modelo explante renal minimiza fatores de variabilidade a resposta oxidativa tecidual, como  
190 maior controle de condições experimentais facilitando sua compreensão, mas por ser um  
191 método pouco utilizado, levanta novos questionamentos quanto a replicação da resposta em  
192 modelos vivos.

193

#### 194 **5.4 Conclusão**

195

196                   O modelo de explante renal é viável na avaliação antioxidante e renoprotetora  
197 de uma substância. Assim conclui-se que o desoxinivalenol nas condições avaliadas promoveu  
198 lesão tubular renal. Conseqüentemente, torna-se claro que o ácido fítico foi eficaz no controle  
199 da lesão tubular aguda induzida por desoxinivalenol, tendo assim efeito protetor, com respostas  
200 positivas nas características histológicas, bioquímicas e no estado oxidativo renal.

201

#### 202 **5.5 Referências**

203

204 ABRUNHOSA, L. et al. Micotoxinas Detectadas En Productos Alimenticios En Portugal:  
205 Revisión. **Revista Bio Ciencias**, v. 2, n. 1, p. 5–31, 2012.

206

207 ALI, B. H. et al. Renal and myocardial histopathology and morphometry in rats with adenine -  
208 Induced chronic renal failure: Influence of gum acacia. **Cellular Physiology and**  
209 **Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 818–828, 2014.

210

211 AOUADI, M.; BINETRUY, B.; CARON, L.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; BOST, F.

- 212 Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. **Biochimie**,  
213 v.88, n.9, p. 1091-8, set. 2006.  
214
- 215 ARNHOLD, A. L.; HECK, T. G. Método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
216 (TBARS), e sua importância para a avaliação da peroxidação lipídica em diversas aplicações.  
217 **Salão do Conhecimento UNIJUI 2014**, v. 1, n. 22, p. 1–4, 2014.  
218
- 219 AWAD, W. A. et al. Single and combined effects of deoxynivalenol mycotoxin and a microbial  
220 feed additive on lymphocyte DNA damage and oxidative stress in broiler chickens. **PLoS ONE**,  
221 v. 9, n. 1, p. 1–6, 2014.  
222
- 223 BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre  
224 geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123,  
225 2006.  
226
- 227 BULLERMAN, L.B. Mycotoxins/Classification. En: **Encyclopedia of food microbiology**.  
228 (Eds) Robinson RK, Batt CA, Patel PD. Academic Press, London, p.1512-1519, 2000.  
229
- 230 CHATTOPADHYAY, P. et al. Technetium-99m-labeled deoxynivalenol from *Fusarium*  
231 mycotoxin alters organ toxicity in BALB/c mice by oral and intravenous route. **Journal of**  
232 **Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 18, n. 3, p. 258–263, 2012.  
233
- 234 COSTA, S., SCHWAIGER, S., CERVELLATI, R., STUPPNER, H., SPERONI, E., GUERRA,  
235 M.C. In vitro evaluation of the chemoprotective action mechanisms of leontopodic acid against  
236 aflatoxin B1 and deoxynivalenol induced cell damage. **J. Appl. Toxicol.** v. 29, n.1, p.7–14,  
237 2009.  
238
- 239 DA SILVA, E. et al. Phytic Acid Decreases Oxidative Stress and Intestinal Lesions Induced by  
240 Fumonisin B1 and Deoxynivalenol in Intestinal Explants of Pigs. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 18,  
241 2019.  
242
- 243 DA SILVA MELO, D. A. et al. Evaluation of renal enzymuria and cellular excretion as an  
244 marker of acute nephrotoxicity due to an overdose of paracetamol in Wistar rats. **Clinica**  
245 **Chimica Acta**, v. 373, n. 1–2, p. 88–91, 2006.  
246
- 247 DONADIO, J. V. et al. A CONTROLLED TRIAL OF FISH OIL IN IGA NEPHROPATHY.  
248 **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 18, p. 1194–1199, 1994.  
249 DONG, W.; PESTKA, J. J. Persistent Dysregulation of IgA Production and IgA Nephropathy  
250 in the B6C3F1 Mouse Following Withdrawal of Dietary Vomitoxin (Deoxynivalenol).  
251 **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 38–47, 1993.  
252
- 253 DONG, W.; SELL, J. E.; PESTKA, J. J. Quantitative Assessment of Mesangial  
254 Immunoglobulin A ( IgA ) Accumulation , Elevated Circulating IgA Immune Complexes , and  
255 Hematuria during Vomitoxin-Induced IgA Nephropathy ' 1989 ). Both these functional and  
256 histological. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 197–207, 1991.  
257
- 258 FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas,  
259 sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.  
260
- 261 GUEDES, R. P. et al. Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord.

- 262 **Neurochemical Research**, v. 31, n. 5, p. 603–609, 2006.  
263
- 264 GRAF, E.; EATON, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology and**  
265 **Medicine**, v. 8, n. 1, p. 61–69, 1990.  
266
- 267 GRAF, E.; EMPSON, K. L.; EATON, J. W. Phytic Acid: A Natural Antioxidant. **The Journal**  
268 **of Biological Chemistry**. v. 262, n. 24, p. 11647–11650, 1987.  
269
- 270 GREENE, D. M.; AZCONA-OLIVERA, J. I.; PESTKA, J. J. Vomitoxin (deoxynivalenol)-  
271 induced IgA nephropathy in the B6C3F1 mouse: dose response and male predilection.  
272 **Toxicology**, v. 92, n. 1–3, p. 245–260, 1994.  
273
- 274 HENNEMANN, C. R. de A. et al. Atividade da gama glutamil transpeptidase urinária, dosagens  
275 séricas de uréia e creatinina como meios diagnósticos auxiliares na nefrotoxicidade induzida  
276 por aminoglicosídeo em cães. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 237–244, 1997.  
277
- 278 HOHMANN, M. S. N. et al. 5-Lipoxygenase Deficiency Reduces Acetaminophen-Induced  
279 Hepatotoxicity and Lethality. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 1, p. 1–13, 2013.  
280
- 281 IORDANOV, M.S.; PRIBNOW, D.; MAGUN, J.L.; DINH, T.H.; PEARSON, J.A.; CHEN,  
282 S.L.; MAGUN, B.E. Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase  
283 JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage  
284 to the  $\alpha$ -sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. **Molecular and Cellular Biology**, v.17, n.6, p.3373-  
285 81, jun. 1997.  
286
- 287 JARIWALLA, R. J.; SABIN, R.; LAWSON, S.; BLOCH, D. A.; PRENDER, M.; ANDREWS,  
288 V.; HERMAN, Z. S. Effects of dietary phytic acid (phytate) on the incidence and growth rate  
289 of tumors promoted in Fischer rats by a magnesium supplement. **Nutrition Research**. v. 8, p.  
290 813-827, 1988.  
291
- 292 KATALINIC, V. et al. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by  
293 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant  
294 power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and**  
295 **Pharmacology**, v. 140, n. 1, p. 47–52, 2005.  
296
- 297 KO, K. M.; GODIN, D. V. Effects of phytic acid on the myoglobin-t-butylhydroperoxide-  
298 catalysed oxidation of uric acid and peroxidation of erythrocyte membrane lipids. **Molecular**  
299 **and Cellular Biochemistry**, v. 101, n. 1, p. 23–29, 1991.  
300
- 301 KÖNIGS, M. et al. Cytotoxicity, metabolism and cellular uptake of the mycotoxin  
302 deoxynivalenol in human proximal tubule cells and lung fibroblasts in primary culture.  
303 **Toxicology**, v. 240, n. 1–2, p. 48–59, 2007.  
304
- 305 KOUADIO, J. et al. Lipid metabolism disorders, lymphocytes cells death, and renal toxicity  
306 induced by very low levels of deoxynivalenol and fumonisin B 1 alone or in combination  
307 following 7 days oral administration to mice . **Toxicology International**, v. 20, n. 3, p. 218,  
308 2013.  
309
- 310 KROGH, P.; ELLING, P. Mycotoxic Nephropathy. **Vet.Sci.Commun.**, v.1, p.51-65, 1977.  
311

- 312 MALDONADO, P. D. et al. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative  
313 stress and renal damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 3, p. 317–324, 2003.  
314
- 315 MATEJOVA, I. et al. The Effect of Mycotoxin Deoxynivalenol on Haematological and  
316 Biochemical Indicators and Histopathological Changes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus*  
317 *mykiss*). **BioMed Research International**. v. 2014, p. 4–9, 2014.  
318
- 319 MELCHERT, A; LAPOSY, C. B; MOTTA, Y. P; GARCIA, A. C. F. Z. Gama-Glutamil  
320 Transpeptidase Urinária Como Indicador De Insuficiência Renal Aguda Induzida Por  
321 Gentamicina Em Cães. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**,  
322 Umuarama, v. 10, n. 2, p. 111–116, 2007.  
323
- 324 MISHRA, S. et al. Role of oxidative stress in Deoxynivalenol induced toxicity. **Food and**  
325 **Chemical Toxicology**, v. 72, p. 20–29, 2014.  
326
- 327 NAKAJIMA, T.; HISHIDA, A.; KATO, A. Mechanisms for protective effects of free radical  
328 scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. **The American journal of**  
329 **physiology**, v. 266, n. 3 Pt 2, p. F425-31, 1994.  
330
- 331 OHKAWA, T. et al. Rice bran treatment for patients with hypercalciuric stones: experimental  
332 and clinical studies. **Journal of urology**, v. 132, n. 6, p. 1140–1145, 1984.  
333
- 334 OZBEK, E. Induction of oxidative stress in kidney. **International Journal of Nephrology**, v.  
335 2012, 2012.  
336
- 337 PÉREZ DE OBANOS, A. et al. Ocratoxina A en plasma humano: nuevos datos de exposición  
338 en España. **Revista de Toxicología**, v. 18, n. 1, p. 19–23, 2001.  
339
- 340 PESTKA, J. J. Deoxynivalenol-induced IgA production and IgA nephropathy-aberrant mucosal  
341 immune response with systemic repercussions. **Toxicology Letters**, v. 140–141, p. 287–295,  
342 2003.  
343
- 344 PREISER, J.C. Oxidative Stress. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 36, n. 2, p.  
345 147–154, 2012.  
346
- 347 RIVERS, B. et al. Evaluation of urine gamma-glutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio as a  
348 diagnostic tool in an experimental model of aminoglycoside-induced acute renal failure in the  
349 dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, n. 4, p. 323–336, 28 jul.  
350 1996.  
351
- 352 RIZZO, A. F. et al. Protective Effect of Antioxidants against Free Radical-Mediated Lipid  
353 Peroxidation Induced by DON or T-2 Toxin. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 41,  
354 n. 1–10, p. 81–90, 1994.  
355
- 356 RStudio Team 2016. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. URL  
357 <http://www.rstudio.com/>.  
358
- 359 RUIZ, M. J. et al. Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells.  
360 **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2718–2724, 2011.  
361

- 362 SANDBERG, A.; CARLSSON, N.; SVANBERG, U. Effects of Inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and  
363 Hexaphosphates on In Vitro Estimation of Iron Availability. v. 54, n. 1, p. 159–161, 1989.  
364
- 365 SCHUSTER, A. et al. Role of lipid peroxidation in the toxicity of T-2 toxin T-2 toxin. **Toxicon**,  
366 v. 25, n. 12, p. 1321–1328, 1987.  
367
- 368 SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl  
369 groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1 jan.  
370 1968.  
371
- 372 SILVA, W. T. et al. Efeito renoprotetor dos flavonoides do vinho na nefrotoxicidade do  
373 imunossupressor Tacrolimus. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 3, p. 388–392, 2011.  
374
- 375 TRUJILLO, J. et al. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. **Redox**  
376 **Biology**, v. 1, n. 1, p. 448–456, 2013.  
377
- 378 WAGNER, E.F.; NEBREDA, A.R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in  
379 cancer development. **Nature Review Cancer**, v.9, n.8, p.537–49, ago. 2009.  
380
- 381 WARGO, K. A.; EDWARDS, J. D. Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity. **Journal of**  
382 **Pharmacy Practice**, v. 27, n. 6, p. 573–577, 2014.  
383
- 384 XIAO, H.; TAN, B.E.; WU, M.M.; YIN, Y.L.; LI, T.J.; YUAN, D.X.; LI, L. Effects of  
385 composite antimicrobial peptides in weanling piglets challenged with deoxynivalenol: II.  
386 Intestinal morphology and function. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 10, p. 4750–4756,  
387 2013.

## 388 5. CONCLUSÃO

389

390 Concluímos que o modelo de explante renal foi eficaz para avaliação  
391 morfológica, bioquímica e de estresse oxidativo frente a lesão induzida por uma substância  
392 nefrotóxica. Assim observamos que quatro horas de incubação garante a manutenção das  
393 estruturas morfológicas e funcionais capaz de responder a uma agredção.

394 Por meio do modelo ex vivo proposto, observou que o desoxinivalenol  
395 realmente possui ação nefrotóxica, induzindo a necrose tubular, sendo o estresse oxidativo uma  
396 das prováveis vias de lesão pela exposição a micotoxina.

397 Portanto, ao concluirmos que o ácido fítico um conhecido antioxidante,  
398 desempenhou no modelo de explante na concentração de 5  $\mu$ M a função de renoproteção,  
399 melhorando as condições histológicas, bioquímicas e de capacidade antioxidante das amostras,  
400 mesmo quando exposta ao desoxinivalenol, levantamos novas possibilidades terapêuticas e  
401 nutracêuticas com enfoque em renoproteção.

402 Assim, novos estudos que proporcionem otimização do modelo como maior  
403 tempo de incubação, resposta a diferentes substâncias nocivas ao tecido, utilização de outros  
404 marcadores de lesão renal e maior compreensão do processo oxidativo se fazem necessários,  
405 abrindo possibilidade de novas abordagens nas doenças renais, visando precocidade diagnóstica  
406 e intervenção terapêutica.

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

## ANEXO A

Orientações aos autores da Revista: Alternatives to animal experimentation (ALTEX)  
utilizadas no ARTIGO A

### 1. AUTHOR GUIDELINES

**ALTEX – Alternatives to Animal Experimentation publishes open access academic articles on the development and implementation of alternatives to the use of animals for scientific purposes and informs on international developments in this field.**

The use of animals for scientific purposes includes all experimental procedures involving the use of animals in testing, research, and education or to obtain tissues, organs, and other animal-derived products which may cause pain, suffering, distress or lasting harm to animals. ALTEX is committed to ensuring that all research published gives full consideration to animal welfare and ethical issues.

ALTEX publishes research articles, concept articles, opinion articles, reviews, consensus reports, short communications, letters, comments, corners and meeting reports. Current news and events are posted online.

Articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is appropriately cited (CC-BY). Copyright on any article in ALTEX is retained by the author(s). Unedited Epub versions of main articles and short communications are published with open access upon their acceptance.

### 2. SUBMISSION

**2.1 Research articles, opinion articles, concept articles, reviews, consensus reports, short communications and letters.**

Upload your manuscript as one full pdf file with page and line numbers and including figures, tables, boxes and supplementary data for review once all items in the submission preparation checklist are completed. The manuscript does not need to adhere to the "Style requirements for publication" at this stage but should include all elements necessary for an evaluation of the scientific content of the work. Specifically, studies involving animal experiments must be reported in accordance with the ARRIVE or GSPC guidelines, see below; images, tables and statistics must be prepared in accordance with good practice.

You may also upload a cover letter alerting the editor to the scientific importance of the manuscript, to any copyright issues, and/or suggesting up to five potential reviewers who are not former coauthors (provide full names, affiliations, and e-mails).

For submission, you will need to enter full names, affiliations, e-mail addresses, and [ORCID ID](#) (if available) for each author.

Opinion articles may be suggested for the Food for Thought ... section. "t4 Workshop Reports" are consensus reports authored by the t4 collaboration.

**2.2 Meeting reports, corners, news, letters, comments**

ALTEX welcomes submissions that are relevant to the 3Rs field for these sections. Please contact the editorial office to discuss the appropriate length and layout. Please upload manuscript as a .docx file.

469

470

### 3. EVALUATION

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

### 4. PUBLICATION

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

### 5. STYLE REQUIREMENTS FOR PUBLICATION

505

506

507

#### 5.1 General guidance for all submissions

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

Articles having no relevance to alternatives to animal experimentation or articles of low scientific value are rejected upon an internal review. Two external experts' reviews are obtained for academic articles that pass internal review. In case of disagreement, a third review is commissioned. The evaluation takes into account the scientific merit of a manuscript and its contribution to animal welfare and the 3R principle. Reviewers recommend whether the manuscript should be accepted, revised or declined. The editor in chief decides whether to request revisions, require resubmission of a revised version, accept or reject a manuscript. The blinded content of the external reviews is sent to the authors independent of whether the manuscript is accepted for publication. Revised versions must be uploaded together with a detailed point-to-point reply whereupon the editor may request reviewers to reassess the manuscript before making a final decision.

Upon acceptance for publication, upload separate .docx, .odt or .rtf files of text, tables and boxes as well as separate figure files and supplementary data files prepared according to the "Style requirements for publication" detailed below.

ALTEX will bill authors an article processing charge of € 2,000 per full manuscript (Food for Thought ... articles, research articles, reviews, consensus reports) and € 1,000 per short communication upon acceptance for publication. These publication costs include the costs of publishing manuscripts upon acceptance as an unedited online first version and of publishing the final manuscript in the print and online version of the journal. Include a billing address with the final version of the manuscript. Note that ALTEX is an open access journal listed in the Directory of Open Access Journals. Numerous funding institutions, university libraries and scientific institutes support open access publication by contributing to the publication fees. If your organization has no means to cover the publication costs, please state this in the cover letter and ALTEX may choose to waive these. The request for waiver must be co-signed by an institutional official certifying that the authors do not have research funds available for publication costs.

Accepted manuscripts will be published in the online first section upon receipt of final files and clarification of all open issues.

Articles must be written in English. Language should be based on the Chicago Manual of Style (<http://www.chicagomanualofstyle.org/home.html>). Use the international standard measuring system (SI) and add a space between numbers and units, e.g. 10 ml. Use a separate line for equations. Indicate trademarks (™) and registered goods (®). Explain abbreviations when using them for the first time. If several abbreviations are used, add an abbreviation index as a footnote to the Introduction. Technical terms should be explained for readers who are not experts in your particular field. Include page and line numbers. Number sections starting with the Introduction (1); substructure long sections using numbered subheadings, e.g., **1.1**, *1.1.1*, *1.1.2*, **1.2**, etc. Use italics for Latin words, e.g. *in vitro*, *in vivo*, and direct quotes.

519

520

## 5.2 Structure of short communications

521

522

523

524

525

Short communications have no more than 4 printed pages of text (single spaced, 9 pt) and 1 page of figures or tables. Results and discussion may be combined. In addition, a supplementary file describing materials and methods in more detail may be submitted. Otherwise follow instructions below.

526

527

528

529

## 5.3 Structure of Food for Thought ... articles, research articles, reviews, consensus reports

530

There is no length restriction for these article types. Follow the structure set out below:

531

**Article type:** Food for Thought, Research Article, Review Article, Consensus Report, Workshop Report, Concept Article.

532

533

**Title:** Short and informative; no abbreviations; 12 words maximum

534

535

**Authors:** Full first names and initials; superscripts after names refer to affiliations; authors with the same affiliation are given the same superscript. Example: Jane R. Doe<sup>1</sup>, John T. Smith<sup>2</sup> and Marie Potter<sup>1</sup>

536

537

**Affiliations:** Institute, town, country in accordance with the superscripts after the authors' names. Do not include street names or post office boxes.

538

539

**Summary:** 250 words maximum; provide a concise summary of the main findings.

540

541

**Keywords:** 3-5 words or phrases; do not use words from the title as these are indexed automatically; consider listing experimental techniques or methodology, potential applications and/or [MeSH](#) terms that represent the study's content.

542

543

**Disclaimer:** If applicable, add your institute's disclaimer

544

545

**1 Introduction:** Provide brief and succinct background on the study and explain its purpose. Include a specific statement concerning the relevance of the article regarding the development and promotion of alternatives to the use of animals for scientific purposes.

546

547

### 2 Materials and methods:

548

549

Give a complete account of the animals or human subjects (if applicable), materials used and procedures followed in the study in sufficient detail to allow repetition of the study.

550

551

*Experiments* *on* *animals:*

552

- do not list animals as materials;

553

- Indicate which institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed;

554

555

- describe animal experiments in detail according to the ARRIVE guidelines: <http://www.nc3rs.org.uk/ARRIVE> and/or the Gold Standard Publication Checklist: <http://bit.ly/1na53H9>; indicate species and, where appropriate, strain of the animal;

556

557

total number of animals used throughout the study; experimental design including statistical design and analysis; randomization and blinding; other pertinent details relating to the lifetime experience of the animals, including housing and care; refinements of experimental procedures to reduce suffering; pain management; humane end points; and euthanasia methods;

558

559

- Confirm that the study went through a process of ethical review prior to the study commencing; this should include a weighing of the likely adverse effects on the animals against the benefits likely to result from the work;

560

561

- confirm that the potential for application of the 3Rs was rigorously researched prior to starting, and every opportunity was taken during the course of the study to implement each of them;

562

563

- confirm that animal husbandry and care was in accordance with contemporary best practice and all individuals involved with the care and use of animals were trained and skilled to an

564

565

566

567

568

569 acceptable level of competency, with euthanasia carried out according to contemporary best  
570 practice;

571 - confirm that appropriate anesthesia and analgesia were used to minimize pain and distress,  
572 and humane endpoints were defined and implemented where appropriate.  
573 ALTEX recommends following the PREPARE guidelines (<https://norecopa.no/PREPARE>) in  
574 planning studies using animals to ensure that the above requirements are met and the respective  
575 information is documented during the study. ALTEX further recommends the use of the  
576 Experimental Design Assistant (<https://www.nc3rs.org.uk/experimental-design-assistant-eda>)  
577 for the design of experiments using animals to ensure that they use the minimum number of  
578 animals consistent with their scientific objectives, methods to reduce subjective bias, and  
579 appropriate statistical analysis.

580

581 **3. Results:** Objectively describe the obtained results; illustrate these as appropriate with  
582 figures or tables. Number tables and files in the order of appearance in the text using Arabic  
583 numerals, e.g., (Tab. 1) or (Fig. 1). State the number of independent samples (biological  
584 replicates) and the number of replicate samples (technical replicates) and report how many  
585 times each experiment was repeated. Illustrations should provide information about the  
586 variability within the data. Report statistical analyses of variation using standard deviation  
587 (SD), confidence intervals (CI) or standard error of the mean (SEM) as appropriate.

588

589 **4 Discussion:** Objectively interpret the obtained results in light of relevant literature.

590 **References:** Authors are responsible for the accuracy of the references.

591 - Citations in the text should be marked with name/s of the author/s and the year of publication,  
592 e.g., (Harvey and Smith, 2008; Kimmel et al., 2010). In case of several publications by the same  
593 author/s within one year, distinguish them with a, b, c, etc. after the year, e.g. (Miller et al.,  
594 2017b).

595 - Format the references at the end of the text according to the examples below and in alphabetic  
596 order of the first authors. If you use Endnote or RefWorks, you may download  
597 the ALTEX style here (ALTEX6 style for Endnote (.ens file) - last update April 24, 2017)  
598 or ALTEX\_a style for RefWorks (.rwb file) – last update August 16, 2017).

599 - Include full DOIs or, if not available, other full content links. Search for DOIs  
600 here: <https://doi.crossref.org/simpleTextQuery>

601 - When referring to a website, place the full URL in a footnote to the text and add "accessed  
602 on" and the date.

603 **Conflict of interest:** Authors who have a financial interest in the publication of the manuscript  
604 may have a conflict of interest. This does not disqualify them from submitting a manuscript to  
605 ALTEX. Declare any author's conflict of interest or declare that the authors have no conflicts  
606 of interest, as appropriate.

607 **Acknowledgements:** Acknowledge sources of funding and contributing persons.

608 **Correspondence to:** Provide the full address, phone number and e-mail address of the author  
609 who is available for correspondence after publication of the manuscript.

610 **Table and figure legends:** Each table or figure must have a caption. The caption may be  
611 followed by a detailed explanation.

612 **Tables, figures, boxes and supplementary files:**

613 *Tables:* Design tables as text tables that can be formatted and edited, not as images.

614 *Figures:* Upon acceptance, you will need to provide all figures in high quality (300 dpi), each  
615 in a separate .jpg, .tif, .png or .ppt file (.ppt only if the figure was drawn in Powerpoint). If the  
616 figure was created in a different program, use the export function. The size of the ALTEX type  
617 area is 27.2 x 17.4 cm. This represents the maximum size for a figure or table. If figures have  
618 multiple panels, mark them with A, B, C and refer to these in the legend.

619 Avoid splicing gel or blot images or indicate borders between different sections; molecular  
620 markers above and below bands of interest must be included in the image.  
621 Include scale bars in microscopic images.  
622 **Copyright:** If using another author's illustration or table, enclose a copyright transfer from the  
623 copyright holder and reference the material accordingly.  
624 Link for obtaining copyright permissions for figure reproductions from other  
625 journals: <http://www.copyright.com/content/cc3/en.html>  
626 **Supplementary files:** Information related to the manuscript may be submitted as  
627 supplementary files. If related research is in press or under review elsewhere, this must be  
628 included as supplementary files for review purposes only for reasons of transparency.  
629