



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Aline de Almeida Azevedo

Estudo do balanço entre MMPs e TIMPs no parênquima renal de ratos com hipertensão renovascular após o transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea

Rio de Janeiro

2019

Aline de Almeida Azevedo

Estudo do balanço entre MMPs e TIMPs no parênquima renal de ratos com hipertensão renovascular após o transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole

Coorientadora: Prof.^a Dra. Laís de Carvalho

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A994 Azevedo, Aline de Almeida.

Estudo do balanço entre MMPs e TIMPs no parênquima renal de ratos com hipertensão renovascular após o transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea / Aline de Almeida Azevedo. – 2019.

100 f.

Orientadora: Alessandra Alves Thole.

Coorientadora: Laís de Carvalho.

Mestrado (Dissertação) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Rins – Doenças - Teses. 2. Hipertensão renovascular - Teses. 3. Metaloproteinases. 4. Células-Tronco Mesenquimais. I. Thole, Alessandra Alves. II. Carvalho, Laís de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.61

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 - 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Aline de Almeida Azevedo

Estudo do balanço entre MMPs e TIMPs no parênquima renal de ratos com hipertensão renovascular após o transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de março de 2019.

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Laís de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Carolina Stumbo Machado
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Marcelo Einicker Lamas
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, a minha família, em especial a minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por guiar o meu caminho.

À minha família, a minha mãe Adelia Senra, ao meu tio Ademar Senra, a minha tia Ruth Senra, que sempre me apoiaram, me incentivaram e fizeram questão de me ajudar.

Às minhas orientadora e coorientadora, Prof.^a Dra. Alessandra Thole e Prof.^a Dra. Laís de Carvalho, que me deram oportunidade para subir mais um degrau na minha carreira, pela orientação, pela compreensão e por terem depositado confiança em mim.

Às professoras Dra. Simone Nunes, Dra. Erika Cortez e Dra. Ana Carolina Stumbo, que ajudaram, ensinaram e contribuíram muito para a minha formação e para o trabalho.

Às minhas amigas Dra. Rafaelle Lira e Dra. Mariana Freitas, que fiz durante a minha iniciação científica, que me ensinaram muito durante essa jornada. Até depois de defenderem e partirem continuam me ajudando. Sou muito grata e feliz por ter a amizade de vocês.

À minha amiga e braço direito Yanca, que me ajudou com os experimentos desde o dia que chegou, às vezes, saindo tarde comigo. E sempre atenta nas minhas explicações. Você é uma aluna de IC raiz.

Aos outros integrantes do grupo renal do Laboratório de Pesquisa em Células-Tronco – LPCT, Camila, Thiago, Marcela, que me ajudaram nas cirurgias, estatísticas e quantificações. Somos uma excelente equipe.

A todos os meus colegas e integrantes do LPCT, Genilza, Daniela, Daphne, Isabelle, Adriana, Beatriz, Felipe, Caroline, Matheus, Gustavo, pela companhia nas bancadas e um apoiando o outro, como uma equipe.

À equipe técnica, Ana Lúcia Rosa Nascimento, Roberto, Josefa, Kátia e Kíssila, obrigada pelo apoio técnico, pelas conversas e pelos conselhos.

Aos professores Dr. Jorge José de Carvalho e Dra. Jemima Fuentes e seus alunos Priscila, Sheila, Victor e em especial a Dra. Bianca Torres, que me ensinou a quantificar as imagens e pelos conselhos, você tem um coração de ouro.

Aos meus colegas da outra pós-graduação Cínthia, Elaine, Elaine, Jessica, Taissa, Souza, Fábio, Felipe, Nívia e Flávia, que deixaram meus sábados mais leves e alegres, pelas conversas, brincadeiras, saídas, apoio e incentivo, por saberem que tinha duas defesas próximas uma da outra.

RESUMO

AZEVEDO, Aline de Almeida. *Estudo do balanço entre MMPs e TIMPs no parênquima renal de ratos com hipertensão renovascular após o transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea*. 2019. 100 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A hipertensão renovascular (HR) é causada pela oclusão parcial da artéria renal, promovendo isquemia renal, e subsequente ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), um ponto de partida para hipertensão arterial sistêmica. A HR é uma doença progressiva e, quando não tratada, leva à doença renal crônica (DRC). No momento, não existe tratamento específico nas fases avançadas da doença, pois a única alternativa é a diálise e/ou transplante renal. Mas, devido ao alto custo dos tratamentos de diálise e à carência de órgãos disponíveis para o transplante, existe a necessidade iminente do desenvolvimento de novas terapias. As células-tronco mesenquimais (CTM) são excelentes candidatas para a terapia celular pela sua capacidade de reduzir a lesão renal, por meio da síntese e liberação de citocinas e fatores de crescimento, preservando a função renal. Porém, é necessário elucidar o remodelamento do parênquima renal através da transição epitélio-mesenquimal (TEM) na presença das CTM. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar os efeitos do transplante de CTM sobre o equilíbrio da expressão de metaloproteinases -2 e -9 e dos inibidores de metaloproteinases-1 e -2 (TIMP) no rim esquerdo de ratos com HR induzida pelo modelo 2 rins 1 clipe (clipagem na artéria renal esquerda - 2R1C). Também foram analisadas as alterações morfológicas e funcionais, a integridade da membrana basal, os conteúdos de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e TGF- β (fator de crescimento transformante beta) e a expressão tecidual de CD68 (macrófago), IL-10 (interleucina), e α -SMA (alfa actina de músculo liso). Ratos machos Wistar (n=18) foram divididos em três grupos: Sham, 2R1C e 2R1C+CTM (receberam transplante após 4 semanas da cirurgia de clipagem). Após 2 semanas do transplante (semana 6) os animais foram eutanasiados e os rins foram coletados e processados para microscopia de luz e western blotting. Os animais 2R1C apresentaram hipertensão arterial, com aumento de ureia, creatinina e proteinúria, enquanto houve redução de proteínas totais séricas. Os rins desses animais apresentaram fibrose, desestruturação da membrana basal, aumento do conteúdo de MMP-2 e -9, TNF- α e TGF- β e aumento da marcação de CD68, α -SMA e TNF- α . Após 15 dias de transplante de CTM os animais apresentaram redução na pressão arterial, da ureia e proteinúria e normalização de proteínas séricas, mostrando que a terapia promoveu restabelecimento da função renal. Além disso, o transplante de CTM reduziu o conteúdo renal de MMP-2 e -9, TGF- β e da marcação para α -SMA, enquanto aumentou o conteúdo de TIMP-1 e -2, contribuindo para restauração da membrana basal, redução da fibrose pela TEM, e restauração dos glomérulos e túbulos renais. Também observamos redução da expressão e marcação do TNF- α , redução da marcação de CD68 e aumento de IL-10. Estes resultados sugerem que o transplante de CTM foi capaz de melhorar aspectos morfológicos e funcionais causados pela HR, promovendo um efeito imunomodulador e o remodelamento do parênquima renal, impedindo a progressão da fibrose através da TEM em modelo experimental de DRC.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Doença renal crônica. Metaloproteinases.

Transição epitélio-mesenquimal. Remodelamento renal.

ABSTRACT

AZEVEDO, Aline de Almeida. *Study of the balance between MMPs and TIMPs in the renal parenchyma in rats with renovascular hypertension after bone marrow mesenchymal stem cell transplantation*. 2019. 100 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Renovascular hypertension (RH) is caused by partial occlusion of the renal artery promoting renal ischemia and subsequent activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), a starting point for systemic arterial hypertension. RH is a progressive disease that, when untreated, leads to chronic kidney disease (CKD). Currently, there is no specific treatment in the advanced stages of the disease, since the only alternative is dialysis and/or renal transplantation. However, due to high cost of dialysis treatments and to the lack of available organs for transplantation, there is an imminent need for the development of new therapies. Mesenchymal stem cells (MSC) are excellent candidates for cell therapy because of their ability to reduce renal damage, through the synthesis and release of cytokines and growth factors, preserving renal function. However, it is necessary to elucidate the renal parenchyma remodeling through the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the presence of mesenchymal stem cells. The main objective of this work was to evaluate the effects of bone marrow MSC transplantation on the expression balance of metalloproteinases -2 and -9 and the inhibitors of tissue metalloproteinases -1 and -2 (TIMP) in the left kidney of rats with RH induced by 2 kidney- 1clip model (clipping of left renal artery – 2K1C). It was also analyzed morphological and functional alterations, basal membrane integrity, TNF- α (tumor necrosis factor alpha) and TGF- β (transforming growth factor beta) contents and tissue expression of CD68 (macrophage), IL-10 (interleukin), and α -SMA (smooth muscle alpha-actin). Male Wistar rats (n = 18) were divided into three groups: Sham, 2K1C and 2K1C+MSC (received transplantation after 4 weeks of clipping surgery). After 2 weeks of transplantation (week 6) the animals were euthanized and the kidneys were collected and processed for microscopy and western blotting. The 2K1C animals presented hypertension, with increased urea, creatinine and proteinuria, while there was a reduction of total serum proteins. The kidneys of these animals showed increased fibrosis, a basement membrane disruption, increased MMP-2 and -9, TNF- α and TGF- β expression, and increased CD68, α -SMA and TNF- α staining. After 15 days of MSC transplantation, the animals showed reduction of blood pressure, urea and proteinuria, and serum proteins normalization, showing that the therapy promoted renal function reestablishment. In addition, MSC transplantation reduced the renal content of MMP-2 and -9, and TGF- β , and the α -SMA staining, while increased TIMP-1 and -2 content, contributing to basal membrane restoration, reduction of fibrosis by TEM, and renal glomeruli and tubules restoration. We also observed reduction of TNF- α expression and staining, reduction of CD68 staining, and increase of IL-10 staining. These results suggest that MSC transplantation was able to improve morphological and functional aspects caused by RH, promoting an immunomodulatory effect and renal parenchyma remodeling, preventing the progression of fibrosis through TEM in an experimental model of CKD.

Keywords: Mesenchymal stem cell. Chronic kidney disease. Metalloproteinases. Epithelial-mesenchymal transition. Renal remodeling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Esquema representativo da estrutura do rim.....	16
Figura 2 –	Representação esquemática de um corpúsculo renal.....	17
Figura 3 –	Esquema representativo do corpúsculo renal e BFG em condições saudáveis e na doença.....	19
Figura 4 –	Esquema representativo das células do corpúsculo renal e dos túbulos.....	21
Figura 5 –	Esquema representativo do mecanismo do estabelecimento da hipertensão renovascular.....	27
Figura 6 –	Esquema representativo dos componentes que compõem a estrutura das MMP.....	29
Figura 7 –	Representação esquemática da TIMP.....	30
Figura 8 –	Esquema representativo da formação da transição epitélio-mesenquimal (TEM).....	31
Figura 9 –	Esquema representativo de células da medula óssea e seus derivados.....	35
Figura 10 –	Esquema representativo das células-tronco mesenquimais liberando as vesículas extracelulares.....	37
Figura 11 –	Desenho experimental.....	42
Figura 12 –	Cirurgia para indução da hipertensão renovascular em ratos.....	43
Figura 13 –	Isolamento de células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos.....	45
Figura 14 –	Transplante das CTM na região subcapsular renal dos animais do grupo 2R1C+CTM.....	47
Figura 15 –	Microscopia de luz com contraste de fase mostrando a morfologia das CTM em cultura.....	56
Figura 16 –	Diferenciação das células-tronco mesenquimais em linhagem adipogênica.....	57
Figura 17 –	Gráfico de histograma representativo da citometria de fluxo.....	58
Figura 18 –	Avaliação do progresso da pressão arterial nos grupos experimentais.....	59
Tabela 1 –	Progressão da pressão arterial (PAS) dos grupos experimentais por um período de 7 semanas.....	59
Figura 19 –	Avaliação da função renal pelas dosagens bioquímicas.....	61

Figura 20 –	Análise macroscópica dos rins direito e esquerdo dos grupos Sham, 2R1C e 2R1C+CTM.....	62
Figura 21 –	Fotomicrografia de cortes do rim esquerdo corados com hematoxilina-eosina nos grupos Sham, 2R1C e 2R1C+CTM.....	63
Figura 22 –	Quantificação da fibrose por coloração com Picro Sirius Red.....	65
Figura 23 –	Fotomicrografia de rim esquerdo corado com Picro Sirius red.....	66
Figura 24 –	Fotomicrografia de rim esquerdo corado com Picro Sirius Red e observado ao com luz polarizada.....	67
Figura 25 –	Fotomicrografia de cortes de rim esquerdo corados com PAS.....	69
Figura 26 –	Expressão de MMP-2 em extratos teciduais de rim nos grupos experimentais.....	70
Figura 27 –	Expressão de TIMP-2 em extratos teciduais de rim nos grupos experimentais.....	71
Figura 28 –	Expressão de MMP-9 em extratos teciduais de rim nos grupos experimentais.....	72
Figura 29 –	Expressão de TIMP-1 em extratos teciduais de rim nos grupos experimentais	73
Figura 30 –	Fotomicrografia de cortes de rins esquerdos imunomarcados com anticorpos específicos para TNF- α	75
Figura 31 –	Quantificação de TNF- α em extratos teciduais de rim nos grupos experimentais	76
Figura 32 –	Fotomicrografia de cortes dos rins esquerdos imunomarcados com anticorpos específicos para CD68.....	77
Figura 33 –	Quantificação de CD68 por imuno-histoquímica nos grupos experimentais	78
Figura 34 –	Fotomicrografia de cortes dos rins esquerdos imunomarcados com anticorpos específicos para IL-10.....	80
Figura 35 –	Expressão de TGF- β em extratos teciduais de rim esquerdo nos grupos experimentais.....	81
Figura 36 –	Fotomicrografia de cortes dos rins esquerdos imunomarcados com anticorpos específicos para alfa actina de músculo liso (miofibroblasto).....	82
Figura 37–	Quantificação de α -SMA por imuno-histoquímica nos grupos experimentais.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2R1C	2 Rins e 1 clipe
AH	Alça de Henle
ANG	Angiotensina
ANOVA	Análise de variância
AQP-1	Aquaporina
BFG	Barreira de filtração glomerular
CD105	Endoglina
CD133	Prominin-1
CD14	Grupo de diferenciação 14
CD34	Antígeno progenitor de célula hematopoiética
CD45	Antígeno comum dos linfócitos
CD73	Grupo de diferenciação 73
CD79	Grupo de diferenciação 79
c-kit	Receptor de tirosina quinase
CR	Corpúculo renal
CT	Célula-tronco
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DRC	Doença renal crônica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FGF ₂	Fator de crescimento de fibroblasto 2
H ⁺	Íon
HE	Hematoxilina e eosina
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HR	Hipertensão renovascular
IBRAG/UERJ	Instituto de biologia Roberto Alcantara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1 β	Interleucina 1 beta
iPS	Célula-tronco de pluripotência induzida
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MB	Membrana basal
MBG	Membrana basal glomerular
MCP	Proteína quimioatraentes de monócitos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinases de matriz
MO	Medula óssea
MT-MMP	Metaloproteinase transmembrana
Na ⁺	Sódio
NFKB	Factor nuclear kappa B
OUU	Obstrução ureteral unilateral
P1/P3	Primeira, terceira passagem
PA	Pressão arterial
PAS	Ácido periódico de schiff
PAS	Pressão arterial sistêmica
PBS	Tampão fosfato salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PGE ₂	Prostaglandina
PSR	Picro sirius red
Sca-1	Antígeno 1 de célula-tronco
SFB	Soro fetal bovino
SITC	Comitê de células-tronco mesenquimais e teciduais da Sociedade Internacional de terapia
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TCD	Túbulo contorcido distal
TCP	Túbulo contorcido proximal
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TIMP	Inibidores de metaloproteinase tecidual
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
t-PA	Plasminogênio tecidual

TRD	Túbulo reto distal
TRP	Túbulo reto proximal
TβRII	Receptor do fator de crescimento transformador beta
VE	Vesículas extracelulares
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
αSMA	Alfa actina de musculo liso

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
x	Multiplicação
<	Menor
≤	Menor ou igual
°C	Graus Celsius
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
μl	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micromolar
dL	Decilitro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
g	Gramma
KDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mL	Mililitro
N	Normalidade
Rpm	Rotação por minuto
α	Alfa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	40
1.1	Geral	40
1.2	Específicos	40
2	MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1	Animais	41
2.2	Grupos experimentais	41
2.3	Indução da hipertensão renovascular	42
2.4	Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais de medula óssea	43
2.5	Indução da diferenciação das células-tronco mesenquimais para caracterização	46
2.6	Caracterização das células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo	46
2.7	Transplante das CTM na região subcapsular do rim	47
2.8	Pressão arterial	47
2.9	Dosagem bioquímica sérica e urinária	48
2.10	Quantificação da creatinina e da ureia no plasma	48
2.11	Quantificação das proteínas totais plasmáticas e urinária	49
2.12	Processamento do tecido renal para análise na microscopia de luz	50
2.13	Análise qualitativa e quantitativa de colágeno por Picro Sirius Red	51
2.14	Coloração de PAS (Ácido Periódico-Schiff)	51
2.15	Imunohistoquímica	52
2.16	Western blotting	53
2.17	Análise estatística	54
3	RESULTADOS	55
3.1	Cultura de células-tronco mesenquimais da medula óssea	55
3.2	Diferenciação das células-tronco mesenquimais em linhagem adipogênica (<i>in vitro</i>)	56
3.3	Caracterização das CTM por citometria de fluxo	57
3.4	Avaliação da pressão arterial	58

3.5	Avaliação das dosagens séricas de creatinina, ureia, proteínas totais e proteinúria	50
3.6	Análise macroscópica dos rins nos diferentes grupos experimentais.....	61
3.7	Análise histológica dos rins nos grupos experimentais.....	62
3.8	Avaliação quantitativa e qualitativa do colágeno por Picro Sirius Red.....	64
3.9	Avaliação da integridade da membrana basal por coloração de ácido periódico-schiff.....	68
3.10	Análise da expressão da metaloproteinases 2 (MMP-2) após o transplante de CTM.....	70
3.11	Análise da expressão do inibidor de metaloproteinases tecidual 2 (TIMP-2) após o transplante de CTM.....	71
3.12	Análise da expressão da metaloproteinases 9 (MMP-9) após o transplante de CTM.....	72
3.13	Análise da expressão do inibidor de metaloproteinases tecidual 1 (TIMP-1) após o transplante de CTM.....	73
3.14	Análise qualitativa e quantitativa do fator de necrose tumoral (TNF-α).....	74
3.15	Análise da marcação de CD68 após o transplante de CTM.....	76
3.16	Avaliação de citocina anti-inflamatória IL-10 (interleucina 10) após o transplante de CTM.....	79
3.17	Análise da expressão do fator de crescimento de transformação beta (TGF-β) após o transplante de CTM.....	81
3.18	Avaliação da marcação de miofibroblasto após o transplante de CTM.....	81
4	DISCUSSÃO.....	84
	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92

INTRODUÇÃO

Morfofisiologia renal

O sistema urinário consiste em um par de rins, um par de ureteres, que se conectam dos rins à bexiga, e em uma uretra, que se estende da bexiga até a parte externa do corpo. Os rins exercem várias funções importantes, como promover a manutenção da homeostase, eliminando vários resíduos metabólicos, água, eletrólitos e não-eletrólitos em excesso por meio da filtração sanguínea e eliminação na urina. Os rins também desempenham atividade endócrina, sintetizando e liberando os hormônios renina, que atua no controle da pressão arterial, e eritropoetina, que atua na hematopoese regulando a formação dos eritrócitos. Os rins também atuam na ativação da vitamina D₃ (Junqueira & Carneiro, 2017; Ross & Pawlina, 2016; Scott & Quaggin, 2015).

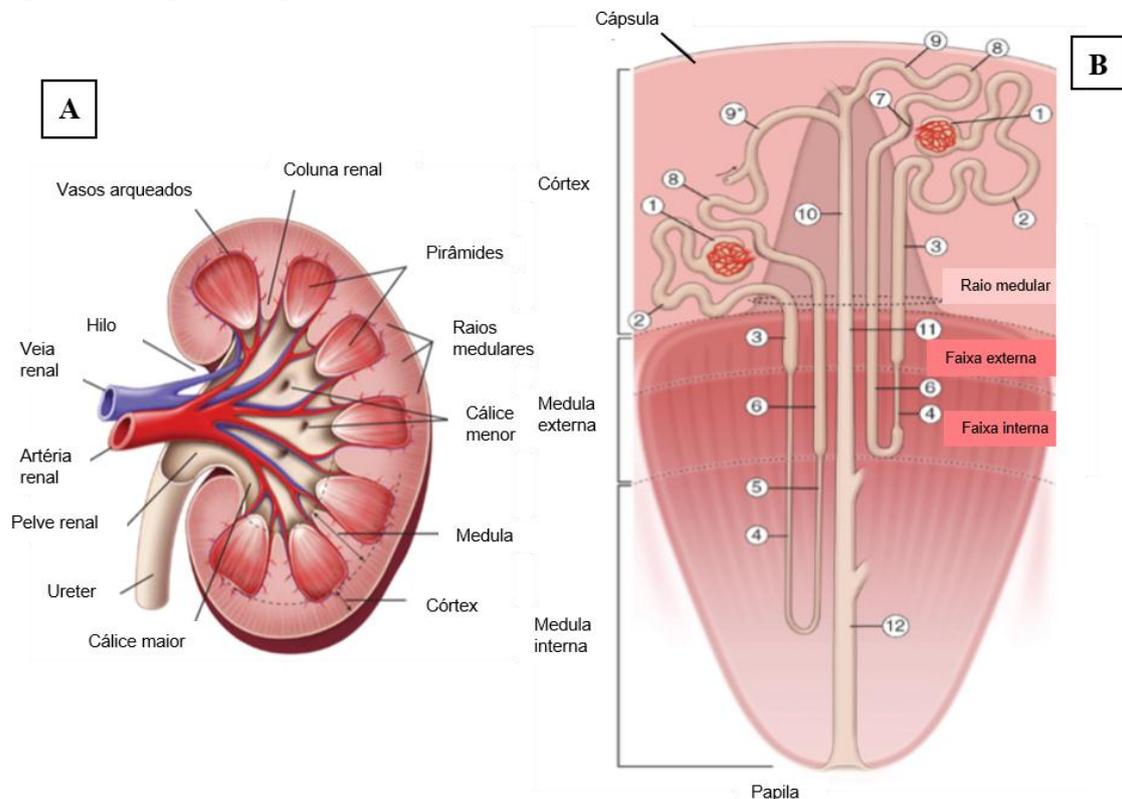
Os rins são órgãos avermelhados, em formato de feijão, localizados lateralmente à coluna vertebral, no espaço retroperitoneal da parede abdominal posterior. Cada rim é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, constituída por uma camada de fibroblasto e fibras colágenas (camada mais externa) e de miofibroblasto (camada mais interna). Os rins possuem uma borda convexa e outra côncava, na qual se localiza o hilo, onde entram e saem vasos sanguíneos, nervos e ureteres. No hilo, também existem cálices que se unem para formar a pélvis renal, parte superior dilatada, onde vai ser coletada toda a urina formada nos túbulos (Figura 1A) (Junqueira & Carneiro, 2017; Ross & Pawlina, 2016).

Os rins são formados por duas regiões distintas, a região da medula, constituída por túbulos retos dos néfrons e ductos coletores, e a região do córtex, constituída por néfrons e túbulos coletores. A região medular é formada por pirâmides medulares (Malpighi), nas quais o ápice se associa aos cálices renais e as bases se ligam à região cortical pelos raios medulares (Figura 1A). Na região cortical, os néfrons e os túbulos coletores são os componentes do túbulo urinífero, envolto por uma lâmina basal (Junqueira & Carneiro, 2017; Ross & Pawlina, 2016).

O néfron é a unidade estrutural e funcional fundamental do rim, no qual a urina é produzida e concentrada ao longo do seu comprimento. O néfron é constituído pelo corpúsculo renal (CR), túbulo contorcido proximal (TCP), túbulo reto proximal (TRP), alça de Henle (AH) tanto a porção espessa quanto a porção delgada, o túbulo contorcido distal

(TCD) e túbulo reto distal (TRD) (Figura 1B) (Ross & Pawlina, 2016; Scott & Quaggin, 2015).

Figura 1 - Esquema representativo da estrutura do rim



Legenda: A- Organização estrutural do rim, B- Organização estrutural do néfron e dos túbulos. 1- Corpúsculo renal, 2- túbulo contorcido proximal, 3- túbulo reto proximal, 4- ramo delgado descendente, 5- ramo delgado ascendente, 6- ramo ascendente espesso (túbulo reto distal), 7- mácula densa localizada no ramo ascendente espesso, 8- túbulo contorcido distal, 9; 9*- túbulo, 10- ducto coletor cortical, 11- ducto coletor medular externo e 12- ducto coletor medular interno.

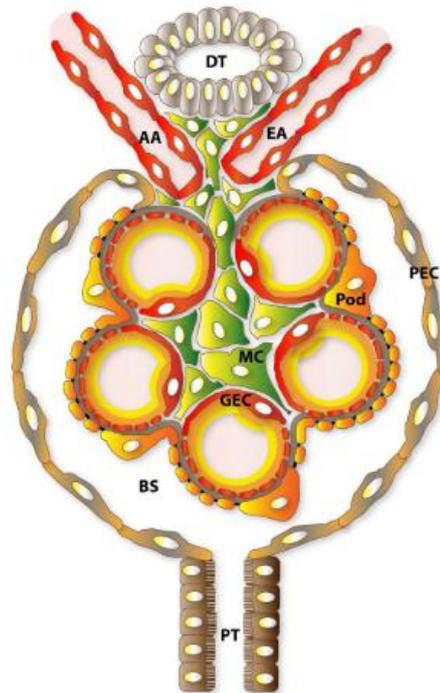
Fonte: Ross & Pawlina, 2016.

O CR é formado por um tufo de capilares tortuosos (glomérulo) e pela cápsula de Bowman envolvendo o glomérulo e, entre estas duas estruturas localiza-se o espaço capsular. O CR apresenta um polo vascular, constituído por artéria aferente e artéria eferente, e um polo urinário, que faz ligação com o túbulo contorcido proximal. A cápsula de Bowman possui um folheto interno ou visceral, região junto aos capilares glomerulares, e o folheto externo ou parietal, limitando o corpúsculo renal. O folheto parietal da cápsula é composto por epitélio simples pavimentoso sobre a lâmina basal e uma fina camada de fibras reticulares. Já o folheto visceral é constituído por células epiteliais modificadas chamadas de podócitos, com seus prolongamentos primários e secundários. Os podócitos estão localizados sobre uma membrana basal no entorno das células endoteliais glomerulares com algumas células

mesangiais, formando o glomérulo (Figura 2) (Garg, 2018; Junqueira & Carneiro, 2017; Scott & Quaggin, 2015).

Além da presença das células mesangiais no glomérulo (Figura 2), compondo a estrutura, essas células também se localizam ao longo do polo vascular (células reticuladas), fazendo parte do aparelho justaglomerular. Estas células sintetizam proteínas de matriz extracelular, fagocitam substâncias normais e patológicas retidas pela barreira de filtração e produzem prostaglandinas e endotelinas para promover a contração da musculatura lisa das artérias glomerulares aferente e eferente. Além disso, as células mesangiais atuam na regulação da distensão glomerular em resposta à pressão arterial elevada, e secretam moléculas como interleucina-1(IL-1), prostaglandina (PGE₂) e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), que desempenham papel importante, principalmente após uma lesão glomerular (Barton & Sorokin, 2016; Ross & Pawlina, 2016).

Figura 2 - Representação esquemática de um corpúsculo renal



Legenda: DT- túbulo distal, AA- arteríola aferente, EA- arteríola eferente, Pod- podócito, MC- célula mesangial, GEC- célula endotelial glomerular, BS- espaço de Bowman ou capsular, PEC- célula epitelial parietal e PT- túbulo proximal.

Fonte: Scott & Quaggin, 2015.

Os podócitos são células especializadas que formam a base estrutural da barreira de filtração glomerular. Estas células se encontram sobre uma membrana basal glomerular,

revestindo os capilares (Figura 3). Este revestimento se dá pelos prolongamentos primários e secundários que se interdigitam, formando as fendas diafragmáticas. Assim, os capilares, a membrana basal glomerular e os podócitos formam a barreira de filtração glomerular (BFG). O sangue que circula pelos capilares glomerulares é filtrado pela BFG, produzindo o ultrafiltrado glomerular, que é direcionado para o espaço capsular e, posteriormente, para os túbulos. Os podócitos são células dinâmicas que podem promover um inchaço ou retração dos seus prolongamentos, de acordo com a ocasião. Caso ocorra uma lesão na barreira de filtração glomerular, principalmente nos podócitos, as fendas diafragmáticas se retraem, possibilitando a passagem de moléculas grandes, o que gera o quadro de glicosúria e proteinúria, ou albuminúria. O quadro de proteinúria pode se manifestar em várias doenças, como nefropatia congênita, hipertensão, diabetes e doença renal crônica (Barton & Sorokin, 2016; Brinkkoetter & Hagmann, 2018; Garg, 2018; Grahammer, 2017; Scott & Quaggin, 2015).

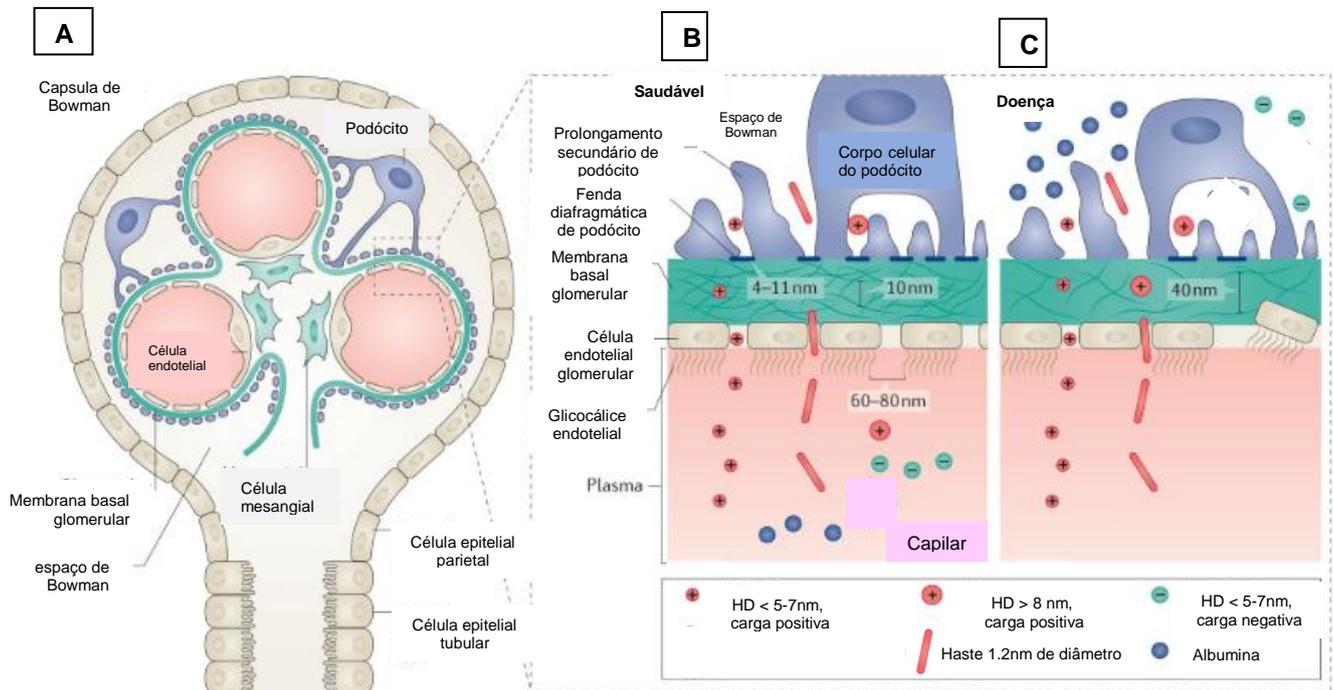
Os capilares glomerulares são caracterizados por um tufo de capilares tortuosos que compõem a BFG. Estes capilares possuem fenestras com cerca de 60-100nm de largura e correspondem a 20% da superfície endotelial permitindo, assim, uma rápida passagem de grandes volumes de fluidos da filtração renal. Essa filtração desempenhada pelos capilares glomerulares, se deve ao fato que tanto o lúmen dos capilares quanto as suas fenestras são revestidos por uma rede fibrosa de glicoproteínas, carregada negativamente (glicocálice). Além disso, os componentes do plasma são absorvidos pelo glicocálice, formando uma camada mais espessa. Desta forma, a estrutura filamentosa e a carga negativa tornam as fenestras mais estreitas e restritivas (Figura 3) (Nazila Kamaly et al., 2017; Scott & Quaggin, 2015).

A membrana basal glomerular (MBG) é um dos constituintes da BFG, composta por colágeno IV, laminina e proteoglicanos, secretados pelas células endoteliais glomerulares e pelos podócitos. A MBG se localiza entre os capilares e os podócitos, atuando como uma matriz intermediária que promove a seletividade. A MBG também pode acumular ligantes pró-angiogênicos e fatores secretados que intervêm a comunicação celular entre os podócitos e os capilares glomerulares. Um dos componentes principais do proteoglicano sulfatado de heparina é o agrina, pois possui uma elevada carga negativa, contribuindo para carga negativa na MBG. Assim, a albumina plasmática, com carga negativa, apresenta uma repulsão eletrostática à MBG, evitando a sua passagem para o espaço capsular e consequente eliminação pela urina (Figura 3) (Nazila Kamaly et al., 2017; Scott & Quaggin, 2015).

Portanto, a BFG isola o espaço vascular do espaço urinário, filtrando moléculas e íons do fluxo sanguíneo e produzindo um filtrado urinário primário. Em condições fisiológicas, a

filtração do sangue pela BFG ocorre por tamanho e carga, certificando que somente água e pequenos solutos (ureia, glicose, aminoácidos e íons minerais) do sangue passem para a urina. Já componentes plasmáticos com alto peso molecular e com carga negativa, como albumina, são retidos no sangue. Qualquer comprometimento a um dos componentes dessa barreira promove proteinúria, características das doenças glomerulares (Figura 3) (Nazila Kamaly et al., 2017).

Figura 3 - Esquema representativo do corpúsculo renal e BFG em condições saudáveis e na doença



Nota: A- Esquema representativo de um corpúsculo renal, mostrando o folheto parietal e visceral; B- barreira de filtração glomerular (capilares, membrana basal e podócitos) saudável com alguns solutos sendo retidos; C- barreira de filtração glomerular (capilares, membrana basal e podócitos) danificada com alguns solutos passando para o espaço capsular. Nota: HD- diâmetro hidrodinâmico.

Fonte: Kamaly et al., 2017.

No polo urinário do corpúsculo renal, o TCP, segundo constituinte do néfron, é o próximo segmento. O TCP apresenta lúmen amplo revestido por epitélio simples cúbico. Suas células possuem, microvilosidade na superfície apical e numerosas mitocôndrias. Abaixo das células epiteliais encontra-se a membrana basal (MB) (Figura 4). Tais características são essenciais, pois é na região do TCP que ocorre a maior parte de absorção, cerca de 60-70% do ultrafiltrado glomerular. As microvilosidades aumentam a superfície para absorção de macromoléculas, as mitocôndrias auxiliam no gasto energético promovido pelo transporte ativo de algumas moléculas e a MB fornece um suporte estrutural, controla a sinalização de

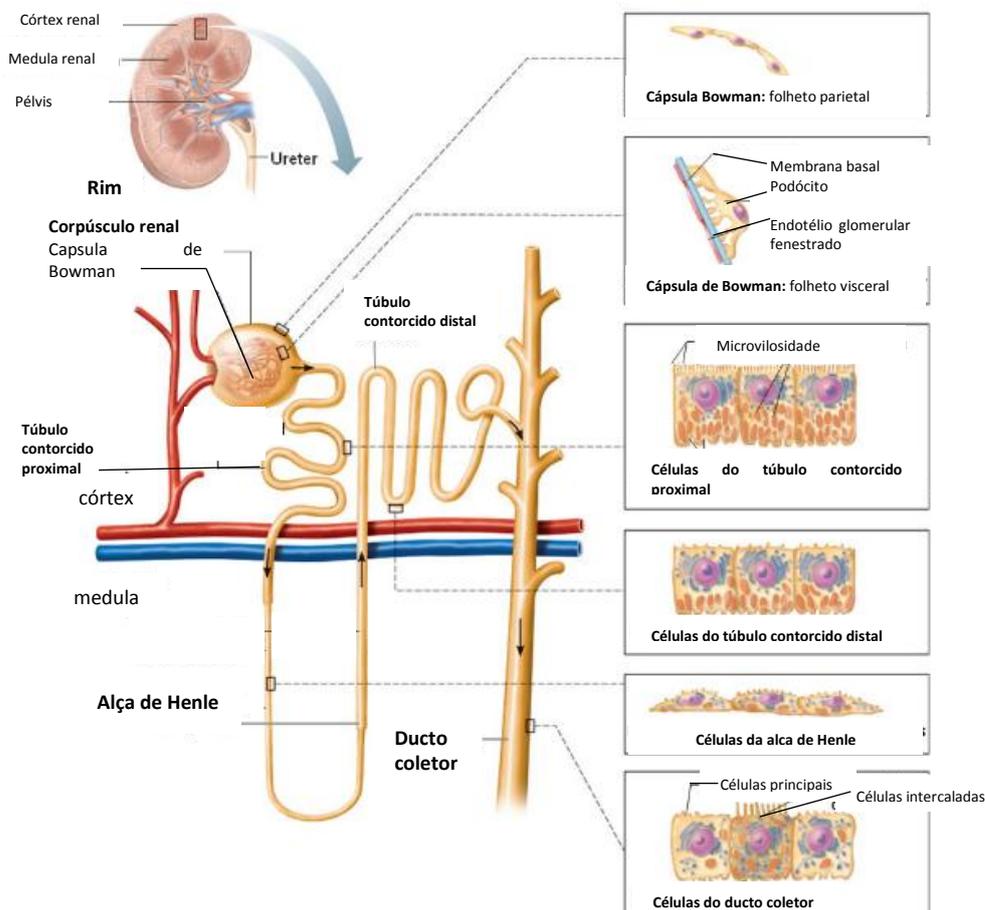
fatores de crescimento e as próprias células que secretam e degradam a MB. As células do TCP absorvem glicose, aminoácidos, cloreto (Cl^-), cálcio, fosfato, bicarbonato e sódio pela bomba Na^+/K^+ ATPase; cotransportadores SGLT2, de H^+ e peptídeos; transportadores GLUT2; transportadores de aminoácidos ácidos, básicos e neutros e; água pela aquaporina (AQP-1), assim, promovendo a homeostase ao longo dos túbulos. Além disso, os TCP excretam substâncias tóxicas do metabolismo, como creatinina, ureia, ácido úrico e substâncias estranhas, como fármacos (Ross & Pawlina, 2016; Taub, 2018; Van Genderen et al., 2018). Portanto, a creatinina, ureia e ácido úrico são biomarcadores laboratoriais para avaliação da função renal. A creatinina é um produto formado a partir do uso da creatina para a contração da fibra muscular, a ureia é um produto do catabolismo proteico e o ácido úrico é um produto do catabolismo das purinas, todos eliminados do organismo pela urina. A elevação da uréia (uremia), do ácido úrico (hiperuricemia) e, principalmente, da creatinina é um indicativo de progressão da doença renal crônica (Kobayashi et al., 2014; Steubl et al., 2016).

O terceiro segmento do néfron é a alça de Henle, uma estrutura em forma de U formada por epitélio simples pavimentoso (região delgada) e epitélio simples cúbico (região espessa) (Figura 4). A alça de Henle também promove absorção de sódio, cloro e água para o equilíbrio hídrico favorecendo, assim, o gradiente de hipertonicidade no interstício medular, concentrando a urina (Dominiczak et al., 2017; Yu, 2017).

O último segmento do néfron é o TCD, constituído por um epitélio simples cúbico, não possui orla em escova, e é impermeável à água (Figura 4). O TCD desempenha um papel importante na regulação do conteúdo de eletrólitos reabsorvidos a partir do filtrado tubular. As células do TCD são as que exibem maior atividade de Na^+/K^+ ATPase, por promoverem reabsorção de sódio (5-10%) e secreção de K^+ no filtrado tubular, regulando a concentração de sais. Estas células do TCD também reabsorvem íons bicarbonato, proporcionando maior acidificação da urina. Além disso, estas células reabsorvem o cloreto (Cl^-) e secretam amônia pela necessidade dos rins de excretar ácido e gerar bicarbonato, regulando o equilíbrio acidobásico do sangue. Na região do TCD adjacente ao corpúsculo renal, as células passam por modificações, tornando-se células colunares com polaridade invertida, região identificada como mácula densa. Estas células são sensibilizadas por íons e água, produzindo moléculas sinalizadoras para que as células justaglomerulares liberem renina na circulação, assim, permitindo a reabsorção de íons Na^+ (Junqueira & Carneiro, 2017; Kortenoeven et al., 2018; Yu, 2017).

Os túbulos coletores (TC) conectam o segmento final do néfron com os ductos coletores (DC), direcionando-se de forma retilínea para as papilas. Os TC delgados possuem um epitélio simples cúbico e, conforme se aproxima das papilas, as células tornam-se cilíndricas. Os ductos coletores possuem dois tipos de células: as principais, que absorvem água, e as intercaladas, que secretam H^+ (Figura 4). Os TC e os DC são responsáveis por reabsorver água pelas aquaporinas-2 reguladas pelo hormônio antidiurético (ADH), assim, definindo a osmolaridade final da urina. Essa região também é alvo do hormônio aldosterona, o qual atua absorvendo mais Na^+ e água, aumentando o volume sanguíneo e elevando a pressão arterial (Kortenoeven et al., 2018; Ross & Pawlina, 2016).

Figura 4 - Esquema representativo das células do corpúsculo renal e dos túbulos



Nota: O esquema representa a disposição do néfron e o ducto coletor, e a morfologia celular ao longo dos túbulos e dos folhetos do corpúsculo renal.

Fonte: <https://antranik.org/the-urinary-system-kidneys/>.

As células justaglomerulares (JG) se encontram na arteríola aferente, próximo ao corpúsculo renal, possuem núcleo esférico e citoplasma com muitos grânulos de secreção de

renina, responsável pela regulação da pressão arterial. As células JG, a mácula densa, localizada no TCD e adjacente ao corpúsculo renal, e as células mesangiais extraglomerulares formam o aparelho justaglomerular. Este aparelho justaglomerular possui um papel importante na regulação da pressão arterial sistêmica (PAS) por meio da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Em condições fisiológicas, o SRAA pode ser ativado pela redução da ingestão de sódio ou, em condições patológicas, pode ser ativado pela redução do volume de sangue circulante por hemorragia ou por redução da perfusão renal pela compressão das artérias renais. Com a ativação do SRAA, as células JG liberam o hormônio renina que converte o angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I). Nos pulmões, a enzima conversora de angiotensina (ECA) converte a Ang I em angiotensina II (Ang II), a qual estimula a glândula suprarrenal a sintetizar e liberar aldosterona. Assim, a aldosterona atua sobre as células principais dos túbulos conectores e ductos coletores renais, aumentando a absorção de sódio e água e secreção de potássio, consequentemente, aumentando o volume sanguíneo e elevando a pressão arterial (PA). Além disso, a Ang II também atua promovendo a vasoconstrição sistêmica, regulando a resistência vascular renal e sistêmica. Entretanto, o descontrole do SRAA contribui para o desenvolvimento e progressão de danos nos rins, hipertensão e doença renal crônica (Chou et al., 2018; Ross & Pawlina, 2016; Stepan et al., 2018).

Doença renal crônica

A doença renal crônica (DRC) é uma doença grave, progressiva, que impacta negativamente a qualidade de vida dos pacientes, podendo levar à morte. Estima-se que ocorreram cerca de 1,19 milhões de mortes no mundo causadas pela DRC em 2016. A DRC foi a 11ª causa de morte no mundo, revelando-se um grande problema de saúde pública global (GBD, 2017; Moody Coca & Sanders, 2018). As causas mais comuns que levam à DRC são a hipertensão arterial, hiperlipidemia, diabetes, obesidade, glomerulonefrite, rins policísticos e doenças estruturais (Heerspink & Zeeuw, 2013; Hsiao, 2018; Ng & Li, 2018).

A DRC é caracterizada por uma perda progressiva dos néfrons que poderá levar à insuficiência renal crônica, consequentemente, havendo a necessidade de diálise ou, até mesmo, transplante renal. Esta perda de função renal devido à lesão glomerular está associada com a redução da taxa de filtração glomerular (TFG) e aumento da albuminúria, proteinúria e

da creatinina. No estágio inicial da lesão renal, várias células, como neutrófilos, linfócitos T, macrófagos, células tubulares e endoteliais atuam no processo importante de reparo tecidual. Porém, a injúria já é o suficiente para promover a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), liberação de fatores pró-fibróticos, como o TGF- β (fator de crescimento transformador) promovendo a fibrose (Heerspink & Zeeuw, 2013; Kefaloyianni et al., 2016; Loboda et al., 2016).

A manifestação da fibrose corresponde à via final comum da lesão progressiva, definida pelo o acúmulo de matriz extracelular, especialmente por células mesenquimais residentes nos tecidos. Fisiologicamente, após qualquer lesão tecidual se inicia um processo de reparo tecidual, no qual várias células e moléculas são envolvidas para promoverem a regeneração, concomitante ou após ao processo inflamatório. Mas em determinado momento, o processo é desregulado, induzindo a cicatrização e tornando um tecido não funcional. Neste processo, várias células estão envolvidas no desenvolvimento e sustentação da fibrose, como células epiteliais, endoteliais, células inflamatórias, e as células de origem mesenquimais, como fibroblastos, pericitos e miofibroblastos que atuam na fibrose (Djudjaj & Boor, 2018; Kefaloyianni et al., 2016).

Alguns trabalhos mostram que o aumento do hormônio angiotensina II tem um papel importante para contribuição da fibrose renal, pois ele induz um gene que codifica um dos fatores de crescimento pró-fibrótico TGF- β 1. Embora a angiotensina II possa estimular a fibrose independente da sinalização do TGF- β . Mas na fibrose, após a sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), a via de sinalização da MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógeno) é ativada, assim, promovendo um aumento de expressão de TGF- β . Desta forma, o TGF- β se liga ao seu receptor TGF- β tipo II (T β RII) ativando as vias de sinalização das SMAD, para que genes codifiquem proteínas envolvidas no processo fibrótico. Além disso, o fator de crescimento TGF- β é o grande responsável pela ativação, proliferação e diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, caracterizado pela expressão de alfa actina do músculo liso (α -SMA). Os miofibroblastos são as principais células efetoras, contrateis, que secretam proteínas de matriz extracelular responsáveis pela fibrogênese renal. Este fator também estimula a síntese de proteínas de matriz, como o colágeno tipo I e tenascina-C e a expressão de RNAm da trombospondina-1 (TSP-1 ou THBS1) pelas células dos túbulos renais (Beusekom & Zimmering, 2018; Kefaloyianni et al., 2016).

Além disso, o TGF- β pode colaborar para a indução da transição epitélio-mesenquimal (TEM), evidenciada pela expressão de α -SMA e vimentina, via expressão gênica induzida do fator de crescimento do tecido conjuntivo profibrogênico (CTGF) e via SMAD 2/3

fosforilada, assim, estimulando a progressão da fibrose renal (Beusekom & Zimmering, 2018). A caracterização da transição epitélio-mesenquimal se dá pela diferenciação das células epiteliais tubulares em células mesenquimais, juntamente com a ruptura da membrana basal, pelas metaloproteinases. Esta ruptura permite a migração das células mesenquimais para o interstício, colaborando para o dano e progressão da fibrose renal (Cheng et al., 2017; Nistico et al., 2012; Zhao, 2013).

A DRC possui um potencial de desenvolver algumas complicações para o indivíduo, como anemia, acidose metabólica podendo afetar os ossos, a nutrição, o metabolismo, até mesmo chegar à falência da função renal e óbito, por associações com doenças cardiovasculares. Caso a DRC seja diagnosticada de forma precoce, estas complicações podem ser evitadas ou retardadas. Porém, infelizmente, a DRC é subdiagnosticada e o tratamento, muitas vezes, realizado de forma inadequada, impossibilitando a oportunidade de prevenção (Bouquemont et al., 2014; Tonelli & Riella, 2014).

No presente momento, não existe tratamento eficaz para estágios avançados da doença e a tentativa de interromper o processo ou estender ao máximo a perda total da função renal é, ainda, um desafio. Portanto, as únicas alternativas de tratamento são a diálise e / ou transplante dos rins. Mas infelizmente, a diálise é responsável somente por substituir a função de filtração do rim, mas não é capaz de substituir a função endócrina e metabólica (Peloso et al., 2015).

Nos últimos 5 anos, no Brasil, o número de pacientes que utilizaram diálise aumentou, anualmente, cerca de 6,3%, sendo 11,2% de pacientes com ≥ 75 anos de idade. Em 2016, cerca de 122.825 pacientes eram mantidos em programas dialíticos no Brasil, com uma taxa de mortalidade anual de 18-25% (Lugon et al., 2018; Pereira et al., 2018). De acordo com os dados de janeiro a setembro de 2018 da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), o número de paciente inscritos na lista de espera para transplante de rim era de 22.429 e apenas 4.342 pessoas realizaram o transplante deste órgão (Abto, 2018). Portanto, a escassez de órgãos para transplante e o alto custo para o sistema de saúde pública com a realização de diálise limita o tratamento da DRC, havendo a necessidade de desenvolver novas terapias funcionais.

Modelo experimental de hipertensão renovascular

A hipertensão renovascular (HR) é uma doença proveniente da estenose da artéria renal, sendo uma das causas mais comuns de hipertensão secundária. De todos os casos de hipertensão, cerca de 1% a 2% da população são causados pela estenose. Esta estenose da artéria renal tem por definição o estreitamento do lúmen arterial renal em mais de 50%, diminuindo o fluxo sanguíneo para os rins, assim, ativando o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e aumentando a pressão arterial sistêmica. Além disso, a redução da perfusão renal pode prejudicar a função renal e levar à doença renal crônica. Diferentes causas podem desencadear a estenose da artéria renal, com maior frequência a aterosclerose da artéria renal e a displasia fibromuscular. Já outras causas são mais raras, como aneurisma, nefrosclerose arteriolar, arterite de Takayasu, malformação arteriovenosa, estreitamento congênito, trombose ou embolia e trauma (Samadian et al., 2017; Smith et al., 2016).

Geralmente são realizados tratamentos para HR por meio de uso de medicamentos com ação no SRAA e angioplastia com colocação de *stents* na artéria renal com estenose. Porém, podem ocorrer complicações durante as cirurgias na tentativa de correção da estenose da artéria renal (Smith et al., 2016). Portanto, a tentativa de novas alternativas terapêuticas é necessária para os pacientes com HR. (Bansal et al., 2015).

Na proposta de induzir a HR, Goldblatt (1934) desenvolveu um modelo que é muito utilizado para o estudo da hipertensão arterial experimental, no qual a HR é induzida por meio de estenose parcial da artéria renal de um dos rins, geralmente o rim esquerdo, aplicando um clipe de prata, denominado o modelo 2 rins – 1 clipe (2R1C) (Goldblatt et al., 1934; Samadian et al., 2017). Este tem sido o modelo experimental utilizado pelo nosso grupo há alguns anos e, também, escolhido para o presente trabalho pelo fato de ser obter facilidade o estabelecimento da HR em animais e por oferecer resultados significativos. Já foi demonstrado pelo nosso grupo que ratos 2R1C desenvolveram hipertensão acompanhado de altos níveis de renina no rim clipado e redução na atividade da Na^+/K^+ -ATPase nos dois rins (Lira et al., 2017). Outro trabalho do grupo, mostrou que o modelo 2R1C levou uma lesão crônica e persistente, que resultou na atrofia do rim clipado e hipertrofia do rim contralateral, além de glomerulosclerose, desestruturação tubular, fibrose, infiltrado celular, redução da expressão de e-caderina, conexina 40 e nefrina, no rim clipado (Oliveira, 2017). Este modelo também demonstrou altos níveis de creatinina sérica e proteínas urinárias, desenvolvimento da hipertensão, fibrose, desorganização glomerular através do espessamento da MBG e

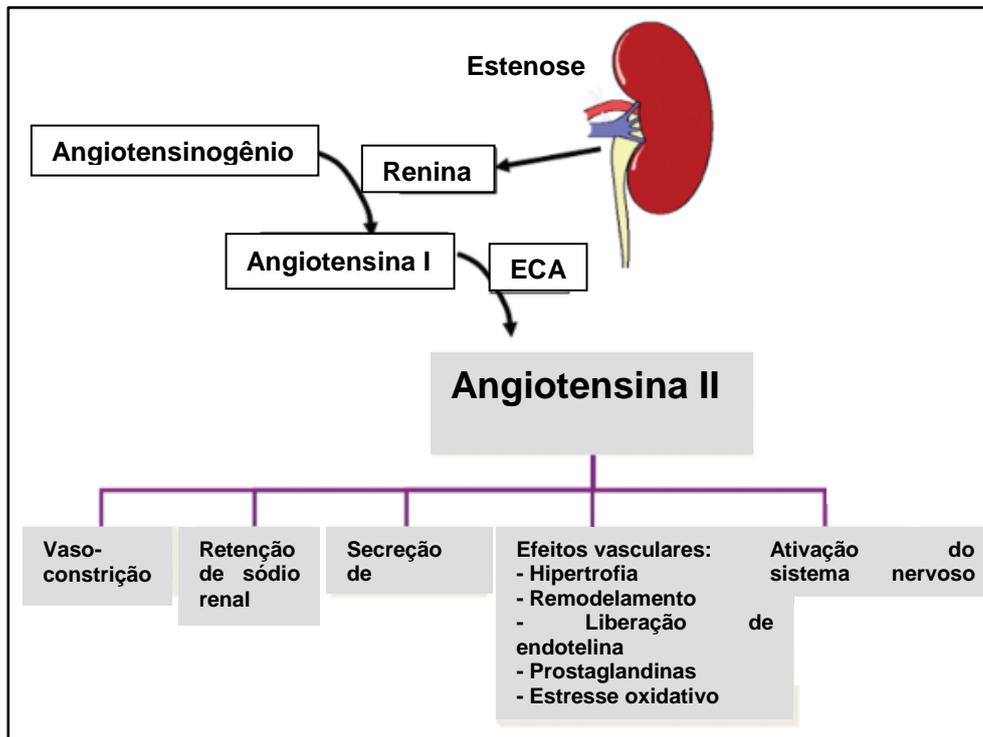
diminuição da fenda de filtração pela menor individualização dos pedicelos, no rim clipado (Freire, 2017).

O modelo 2R1C é um clássico de indução da hipertensão renovascular animal dependente de angiotensina II (Ang II), por promover um aumento da atividade do SRAA iniciada pela renina. Tem sido considerado um modelo bem semelhante à hipertensão renal humana por exibir um aumento transitório da atividade do SRAA e um aumento sustentado da pressão arterial. Este tipo de modelo tem sido muito utilizado para estudos de fisiopatologia da hipertensão e para desenvolvimento de drogas anti-hipertensivas (Amat et al., 2014; Oliveira-Sales et al., 2013).

Após a implantação do clipe de prata, inicia-se uma estenose parcial da artéria, ocasionando isquemia renal, consequência da redução significativa da pressão de perfusão renal. Então, o SRAA é ativado, onde as células JG do rim clipado liberam renina, aumentando a concentração de Ang II circulante e aldosterona. Assim, ocorre um aumento do volume de sangue por meio da reabsorção de sódio e água, acarretando no estabelecimento da HR. Além disso, a Ang II promove vasoconstrição sistêmica, ativação do sistema nervoso simpático e aumento da pressão arterial (Figura 5) (Bryan et al., 2018; Chou et al., 2018; Herrmann & Textor, 2018; Lincevicius et al., 2015; Oliveira-Sales et al., 2013).

A Ang II também atua facilitando as propriedades não hemodinâmicas e possui a capacidade de promover a fibrose por vários mecanismos, como indução da síntese de colágeno, inibição de proteases de clivagem de colágeno, proliferação de fibroblasto, estimulação da secreção do fator de crescimento derivado de plaquetas, inflamação, ativação de mitógenos, síntese do fator nuclear-KB e de TGF- β , o qual está envolvido em muitos processos relacionados à progressão da HR. (Beusekom et al., 2018; Chou et al., 2018; Samadian et al., 2017).

Figura 5 - Esquema representativo do estabelecimento da hipertensão renovascular



Nota: A estenose na artéria renal promove uma diminuição da perfusão do rim, promovendo a liberação da renina, assim, amplificando os sinais sistêmicos para restaurar os níveis de pressão da artéria.

Fonte: Herrmann & Textor, 2018.

Papel das metaloproteinases (MMP) e inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMP) no remodelamento da doença renal crônica

Durante o desenvolvimento da DRC, poderá haver progressão da doença para a doença renal terminal, levando à perda irreversível da função renal. Esta perda deve-se à formação de fibrose, que é uma das alterações patológicas considerada como um desfecho final da DRC, independente da etiologia. A fibrose renal é um processo muito complexo, envolvendo a combinação de múltiplos fatores. A lesão renal gera um infiltrado de células inflamatórias, como macrófago e linfócito, que, juntamente com as células renais lesionadas, liberam mediadores pró-inflamatórios, como TNF, proteínas quimioatraentes de monócito (MCP) e fatores de crescimento, agravando ainda mais a reação inflamatória do rim. Esse agravamento pode ativar a via de sinalização do TGF- β /SMAD e Notch, levando à deposição excessiva de matriz extracelular, bloqueando os capilares intersticiais renais e promovendo hipóxia. Desta forma, as metaloproteinases (MMPs) desempenham um papel importante para o surgimento

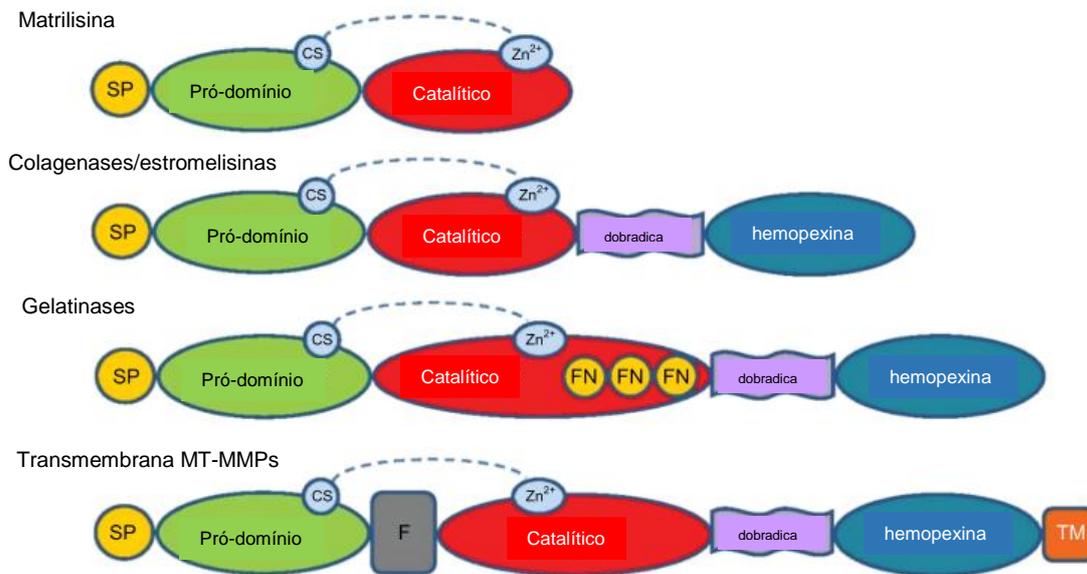
da fibrose, remodelando de forma patológica o parênquima renal (Cheng et al., 2017; Pulido-Olmo et al., 2016).

As MMP são uma grande família de endopeptidases dependentes de cálcio e zinco, responsáveis por degradar todos os componentes da matriz extracelular (MEC), controlando o remodelamento fisiológico. Tradicionalmente, as MMPs eram consideradas como componentes antifibróticos dos tecidos, porém, atualmente, novos paradigmas surgiram, mostrando que o remodelamento da MEC inadequada está associado à atividade das MMPs, principalmente em situações patológicas, como inflamação, remodelação deletéria, estresse oxidativo e apoptose (Parrish, 2017; Pulido-Olmo et al., 2016).

Além disso, as MMPs desempenham um papel na migração, diferenciação e proliferação celular, na apoptose, na angiogênese, na adesão célula-célula e célula-matriz e, também, podem regular as atividades de citocinas e fatores de crescimento. As MMPs são divididas em seis grupos familiares, no qual a classificação se baseia de acordo com a sua forma estrutural e a sua especificidade ao substrato. As colagenases são as MMP-1; MMP-8; MMP-13; MMP-18, as gelatinases são MMP-2 e MMP-9, as estromelinas são MMP-3 e MMP-10, as matrilisinas são MMP-7 e MMP-26, as MMPs transmembranas ou MT-MMP são as MMP-14; MMP-15; MMP-16; MMP-17; MMP-24; MMP-25 e outras MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27, MMP-28) (Kousios et al, 2016; Parrish, 2017; Pittayapruek et al., 2016). As gelatinases desempenham um papel importantíssimo na DRC, pois estão associadas às vias de sinalização de várias células, à endocitose e à ocorrência de inflamação renal na DRC, além de serem um dos responsáveis por promover a transição epitélio-mesenquimal (Cheng et al., 2017; Zhao, 2013).

A estrutura das MMPs gelatinases (MMP-2 e MMP-9) é constituída por um pró-domínio, um domínio catalítico, uma região de charneira (flexível) e um domínio semelhante a hemopexina (figura 6). A sequência do pró-domínio possui resíduo conservado de cisteína para estabilizar e inibir o íon zinco catalítico localizado no domínio catalítico. Essas MMPs são sintetizadas como zimogênios (Pró-MMP) e, quando a região do pró-domínio é clivada, se tornam ativas. Outra estrutura é o domínio semelhante à hemopexina, que é a região onde as MMPs vão exercer a atividade de clivar os substratos, como colágeno IV, fibronectina, laminina e proteoglicana. Além disso, essa região é responsável por interagir com inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), inibindo a sua atividade de degradar a matriz extracelular (Jaoude & Koh, 2016; Parrish, 2017).

Figura 6 - Esquema representativo dos componentes que compõem a estrutura das MMP

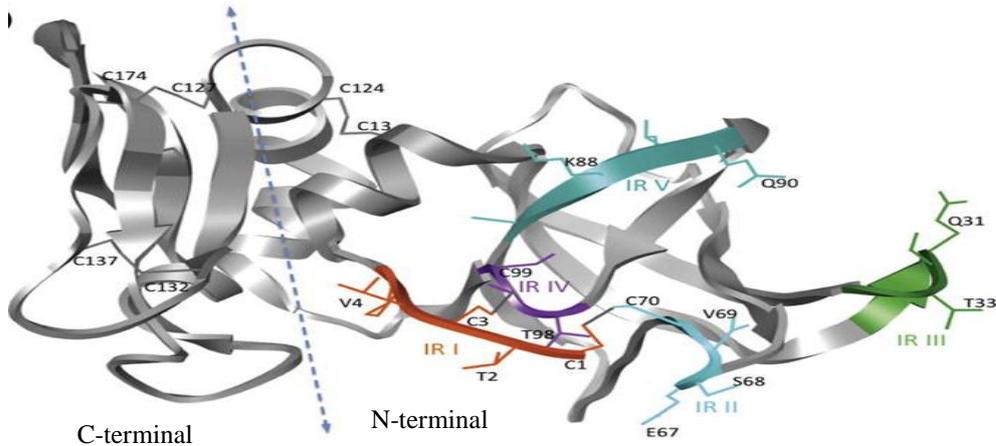


Nota: Esquema mostrando a estrutura das metaloproteínases. As gelatinases são constituídas de um pró-domínio com um peptídeo sinal, ligado com uma região de domínio catalítico com sequências repetidas de fibronectina, em seguida, uma região de dobradura e de um domínio de hemopexina. SP- Peptídeo sinal, CS- troca de cisteína, FN- fibronectina, TM- transmembrana e F- local de clivagem da furina.

Fonte: Jaoude & Koh, 2016.

Os TIMPs atuam realizando interações não-covalentes com a sua porção N-terminal (figura 7) ao zinco catalítico nas MMPs, em proporções de 1:1, inibindo a atividade enzimática das MMPs, interrompendo a degradação da matriz extracelular. Existem quatro tipos de TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4), que são inibidores endógenos que podem ser encontrados ligados a componentes da matriz extracelular (MEC) ou ser secretados por células (Brew & Nagase, 2010; Cheng et al., 2017; Jaoude & Koh, 2016; Parrish, 2017). Em contrapartida, as TIMPs também podem promover ativação das MMPs, como a TIMP-2 que, além de inibir a atividade da MMP-2, também pode promover ativação da MMP-2 em baixa concentração. A MT-MMP (MMP-14/ MMP tipo de membrana) também participa na ativação da MMP-2 mediada pela TIMP-2. Assim, se forma um complexo Pró-MMP-2/TIMP-2/MT-MMP na membrana, ativando a pró-MMP-2 em MMP-2 (Cheng et al., 2017). A TIMP-1 atua inibindo a atividade da MMP-9 e outros membros da família, exceto as MMP-14,-16 e -24 (Parrish, 2017).

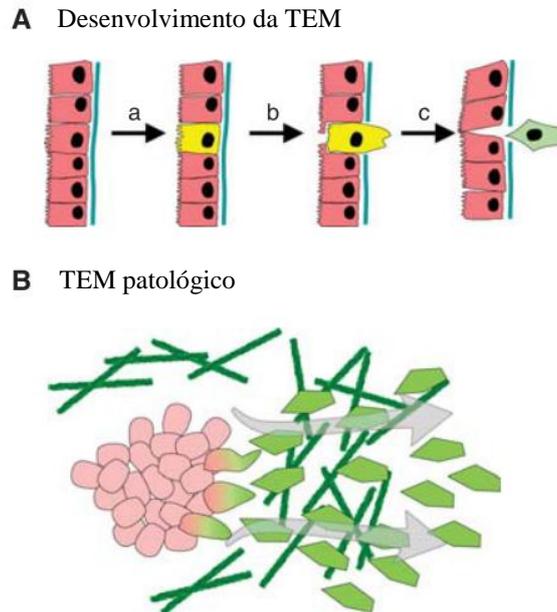
Figura 7 - Representação esquemática da TIMP



Nota: Estrutura tridimensional da TIMP com seus domínios N-terminal e C-terminal de interação.
 Fonte: Brew & Nagase, 2010.

Em condições fisiológicas, no rim humano, as MMP-2 e a MMP-9 são produzidas por células mesangiais, células endoteliais, e por células epiteliais tubulares, mas sempre em baixos níveis. No entanto, essas MMPs desempenham um papel importantíssimo na progressão da fibrose renal, por meio da indução da transição epitélio-mesenquimal (TEM) das células tubulares, caracterizada pela diferenciação das células epiteliais tubulares em células mesenquimais. Alguns autores mostraram que o aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9 está associado à indução da TEM, tanto em modelo *in vitro* com células epiteliais tubulares cultivadas com o fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2), facilitador da TEM, quanto em modelo *in vivo* em camundongos com nefropatia obstrutiva com elevado ativador de plasminogênio tecidual (t-PA). Essas MMPs atuam clivando colágeno tipo IV e laminina, principais proteínas constituintes da membrana basal tubular, causando ruptura da membrana basal, o que contribui para a TEM. Este processo de ruptura da membrana basal (figura 8) permite que as células mesenquimais recém transformadas (fibroblasto) migrem e invadam o espaço intersticial, contribuindo com a progressão da fibrose por meio da deposição de proteínas de matriz extracelular (Cheng et al., 2017; Nisticò et al., 2012; Zhao, 2013).

Figura 8 - Esquema representativo da formação da transição epitélio-mesenquimal (TEM)



Nota: A- Desenvolvimento da TEM envolvendo todo o epitélio, a- células epiteliais que serão submetidas à transição, b- degradação ou ruptura da membrana basal seguida de migração e morfogênese celular das células epiteliais, c- a célula sofre deslocamento mesenquimal fenotípico. B- TEM patológico, onde as células transformadas promovem uma desorganização e secretam proteínas de matriz.

Fonte: Nistico et al., 2012.

Estudos já demonstraram a participação da MMP-9 na indução da TEM, e também observaram que o aumento da MMP-9 induziu a TEM de células endoteliais glomerulares humanas, mas os mecanismos permanecem desconhecidos (Zhao, 2013; Zhao et al., 2017). Wang e colaboradores (2010) mostraram que a baixa expressão de MMP-9 em modelo de obstrução ureteral em camundongos reduziu a TEM, diminuindo a fibrose renal (Wang et al., 2010). Um recente trabalho de Zhao e colaboradores (2017) em modelo de obstrução ureteral unilateral (OUU) em camundongos mostrou que a MMP-9 contribuiu para indução da TEM das células endoteliais peritubulares, promovendo a progressão da fibrose renal. Essa TEM ocorre, normalmente, durante o desenvolvimento de órgãos, mas em condições patológicas ocorrem desequilíbrios em algumas proteínas no processo, tornando a TEM prejudicial para o parênquima, como na fibrose cardíaca, pulmonar, renal e também na progressão do câncer à metástase (Zhao et al., 2017).

Os macrófagos desempenham um papel importante na DRC e na fibrose renal, pois são grandes fontes de fatores de crescimento pró-fibróticos (TGF- β) e de enzimas proteolíticas (MMPs). Os fatores de crescimento pró-fibróticos podem aumentar a população de miofibroblastos pela ativação dos fibroblastos ou pela indução da TEM de células tubulares, e

as enzimas proteolíticas, especialmente a MMP-9, são as grandes responsáveis por induzir a TEM. Esses dados são sustentados por um estudo realizado com macrófagos knockout para MMP-9, onde se observou uma redução significativa da TEM de células tubulares mediada pelos macrófagos, em comparação com macrófagos selvagens. Neste mesmo estudo mostrou que houve dupla marcação para MMP-9 e macrófago e, outra dupla marcação para MMP-9 e α -SMA entre os túbulos no rim no modelo de ratos com OUU, sugerindo o envolvimento na transição (Zhao, 2013).

Em pacientes com nefropatia diabética foi observado um aumento das MMP-2, MMP-8 e MMP-9 no soro e na urina, sugerindo que exista uma correlação entre os níveis das MMPs, principalmente a MMP-9, com o grau de albuminúria nos pacientes (Tashiro et al., 2004; Tan & Liu, 2012). Alguns estudos experimentais com modelo de nefropatia diabética, em animais com diabetes melitus tipo 2 induzida por dieta hiperlipídica, mostram que uma diminuição da atividade das MMPs, particularmente MMP-2 e MMP-9, proporcionou melhora na lesão renal (Rodriguez et al., 2006). Porém, outros estudos em modelo de diabetes tipo I induzida por estreptozotocina em camundongos mostraram a associação do aumento da atividade da MMP-9 com a melhora da lesão renal. Portanto, o envolvimento das MMPs no desenvolvimento de patologias é bastante complexo, havendo sempre a necessidade de estudo dos mecanismos relacionados ao processo (Tan & Liu, 2012).

O uso da terapia celular com células-tronco mesenquimais

Nos últimos anos, a utilização de células-tronco (CT) como terapia celular tem sido uma estratégia promissora. A terapia consiste no transplante de novas células em tecidos danificados, com o objetivo de tratamento para diversas doenças. Essas células possuem habilidades de autorenovação e diferenciação em vários tipos celulares, tornando-se muito atraentes para a terapia celular, podendo ser utilizada em casos de regeneração tecidual ou para impedir a progressão de determinadas doenças, como as doenças renais (Chung et al., 2015; Da Silva et al., 2015; Liu et al., 2014; Lombardi et al., 2016).

As CT são células indiferenciadas que possuem capacidade de proliferação ilimitada e podem dar origem a células especializadas ou não. Durante a divisão celular das CT, cada nova célula pode permanecer indiferenciada ou diferenciar-se em outro tipo celular com sua função especializada, como células musculares, eritrócitos e células do cérebro (Scadden,

2014; Yamashita & Tumber, 2014). As CT são classificadas quanto à sua plasticidade e origem. Em relação à plasticidade, elas podem ser totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. As totipotentes são CT que originam todas as células do embrião e também os anexos embrionários, correspondente à célula-ovo (zigoto). As pluripotentes são células que originam todos os tecidos dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma, denominadas de CT embrionárias. E as multipotentes são CT com capacidade de diferenciação limitada, onde elas já são pré-destinadas para uma linhagem celular, também chamadas de CT adultas (Salvatori et al., 2014; Thakkar et al., 2017).

Outra categoria são as células-tronco adultas que foram reprogramadas à pluripotência de forma artificial. Takahashi e Yamanaka, em 2006, foram os pioneiros em mostrar esta reprogramação, onde os fibroblastos de camundongo, células adultas (somática), se desdiferenciaram tornando-se CT de pluripotência induzida (iPSC), podendo ser via transferência nuclear, fusão celular ou pela manipulação genética. Esta reprogramação permite a utilização das células para descoberta de novos medicamentos, para estudos patológicos e toxicológicos, para avaliação dos efeitos secundários de drogas e para a medicina regenerativa (Cao et al., 2014; Takahashi & Yamanaka, 2013).

Em relação à origem, as CT são classificadas em embrionárias e CT adultas. As CT embrionárias são derivadas da massa celular interna dos blastocistos (embrioblasto) de mamíferos, que se proliferam sempre preservando sua pluripotência, mesmo *in vitro*. Esta descoberta trouxe novas perspectivas para a ciência, por aplicação em diferentes tecidos, pela facilidade de obtenção, possibilidade de congelamento e por sua expansão rápida, mantendo seu cariótipo. Estas células são bastante promissoras para a medicina regenerativa, estimulando a bioengenharia tecidual. Porém, por algumas questões, como éticas, o uso tem sido restrito e a aplicabilidade na clínica oferece riscos por haver chances de desenvolver teratomas e de surgir alguma rejeição imunológica (Martello & Smith, 2014; Salvatori et al., 2014; Wu & Izpisua Belmonte, 2015).

As CT adultas são muito estudadas e utilizadas em ensaios clínicos e na pesquisa básica, por serem facilmente obtidas em tecidos adulto de um doador. As CT adultas podem ser encontradas distribuídas pelo organismo adulto em nichos de vários tecidos e órgãos, como cérebro, sangue periférico, vasos sanguíneos, músculo esquelético, pele, dentes, coração, intestino, fígado, epitélio do ovário, testículos e medula óssea. Acredita-se que tenha um papel importante no mecanismo de reparo tecidual onde residem. Estas células promovem a manutenção da homeostase do tecido e substitui as células mortas por envelhecimento, lesão ou doença, seguindo os limites de regeneração de cada tecido. As CT adultas são células

multipotentes, como exemplo, as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM), encontradas na medula óssea (Rezza et al., 2014; Wang et al., 2014).

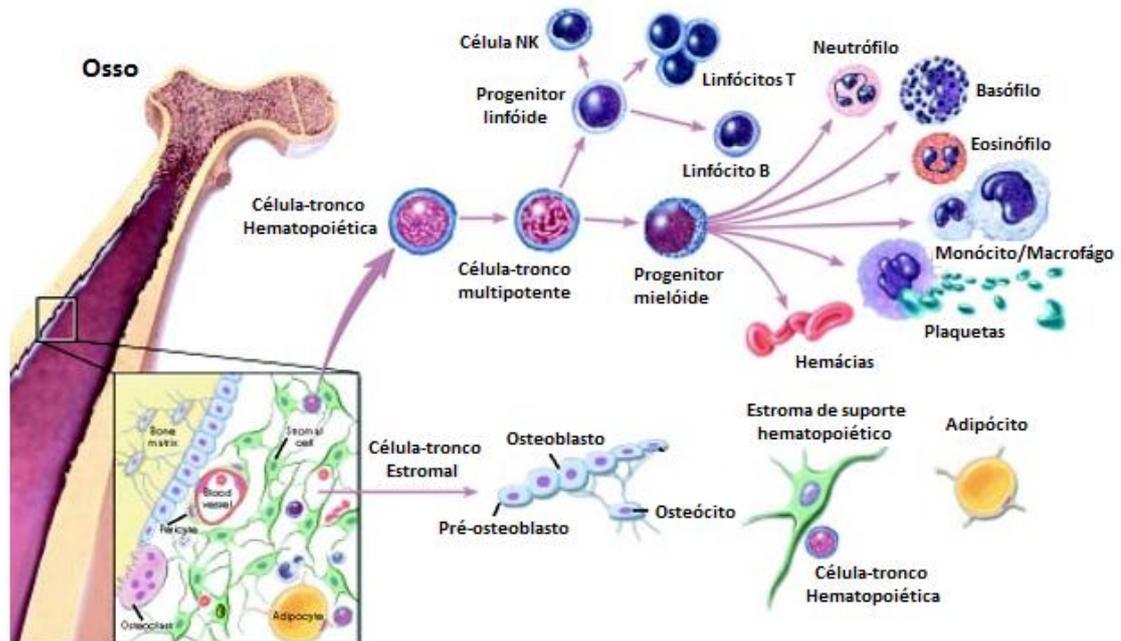
Células-tronco da medula óssea

A medula óssea (MO) apresenta-se como um órgão difuso, muito ativo por produzir bilhões de células por dia, no processo de hematopoese, de acordo com a necessidade do organismo. A MO encontra-se no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos. É distinguida em medula óssea vermelha, região rica em eritrócitos e responsável por produção das células sanguíneas e, medula óssea amarela, onde é rico em adipócitos, responsável por armazenar energia, possui função endócrina, atua no metabolismo ósseo e na regulação do crescimento. A MO é composta por células reticulares associadas às fibras reticulares, formando uma rede, percorrida por vários capilares sinusoides. Entre essas células reticulares encontram-se diferentes tipos celulares, como macrófagos, células adiposas, células precursoras dos eritrócitos, granulócitos, monócitos, plaquetas e células-tronco indiferenciadas. As populações de células-tronco encontradas na MO são as células-tronco hematopoiéticas (CTH), responsáveis por toda a produção de células sanguíneas das linhagens mieloide e linfóide, e as células-tronco mesenquimais (CTM), responsáveis pela formação do estroma da MO, promovendo a homeostasia da medula, regulando a hematopoese (figura 9) (Cuende et al., 2012; Junqueira & Carneiro, 2017; Méndez-Ferrer et al., 2010; Morrison & Scadden, 2014; Wang et al., 2018).

As CTH são multipotentes, possuem um alto potencial de proliferação e auto renovação, permitindo a manutenção da população de CTH em cada indivíduo (Ding & Morrison, 2013; Tamplin et al., 2016). As CTH apresentam algumas moléculas de superfície que são utilizadas como marcadores para sua identificação. Em humanos, são expressos CD34, Sca-1, c-kit (CD117) e, em ratos e camundongos, são expressos CD34-/, c-kit, CD133 (Calloni et al., 2013).

As CTH já são muito utilizadas na terapia celular alogênica para diversos tratamentos de doenças como: leucemias e linfomas, desordens sanguíneas hereditárias, para recuperação da medula pós-quimioterapia e síndromes de imunodeficiência (Wei et al., 2013). Porém, no tratamento de doenças não hematológicas, as CTH são utilizadas em terapias como um dos componentes da fração de células mononucleares da medula óssea (CMMO) (Beiral et al., 2014; Reinders et al., 2014; Zanirati et al., 2015).

Figura 9 - Esquema representativo de células da medula óssea e seus derivados



Nota: Na medula óssea encontramos CTH, que formam todas as células das linhagens mielóide e linfóide, e CTM (estromais), que formam o estroma da MO para dar o suporte e também se diferenciam em outras linhagens mesodérmica, como osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas.

Fonte: NIH, 2012.

Células-tronco mesenquimais

Inicialmente, as células-tronco mesenquimais (CTM) foram identificadas pelo grupo do Freidenstein e colaboradores (1976), que mostraram uma população de células-tronco no estroma da MO com capacidade de se diferenciar em outras células do mesênquima. Nesta pesquisa, foi observado que as células aderentes apresentavam aparência heterogênea, mas após algumas passagens enzimáticas, apresentavam-se morfologicamente mais homogêneas, delgadas, semelhantes a fibroblastos. Desta forma, vários estudos mostraram que as células-tronco aderentes do estroma de MO, atualmente chamadas de CTM, possuem a capacidade de originar várias linhagens celulares, incluindo osteócitos, condrócitos e adipócitos (Bianco, 2014; Dah-Ching Ding & Lin, 2011; Keating, 2012; Spees et al., 2016).

Na tentativa de diminuir a variação e uniformizar a terminologia dos achados científicos em relação às células estromais aderentes de MO, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) estabeleceu critérios mínimos para definir as CTM humanas. Primeiro, as CTM devem ser aderentes ao plástico de

cultura (aderentes ao substrato), quando mantidas em condições padrão de cultivo *in vitro*. Segundo, as CTM possuem expressão positiva de antígenos específicos de superfície CD105, CD73 e CD90, e ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19. E, terceiro, as CTM *in vitro* possuem a capacidade de se diferenciar em osteoblasto, adipócito e condroblasto (Dominici et al., 2006; Mizukami & Swiech, 2018).

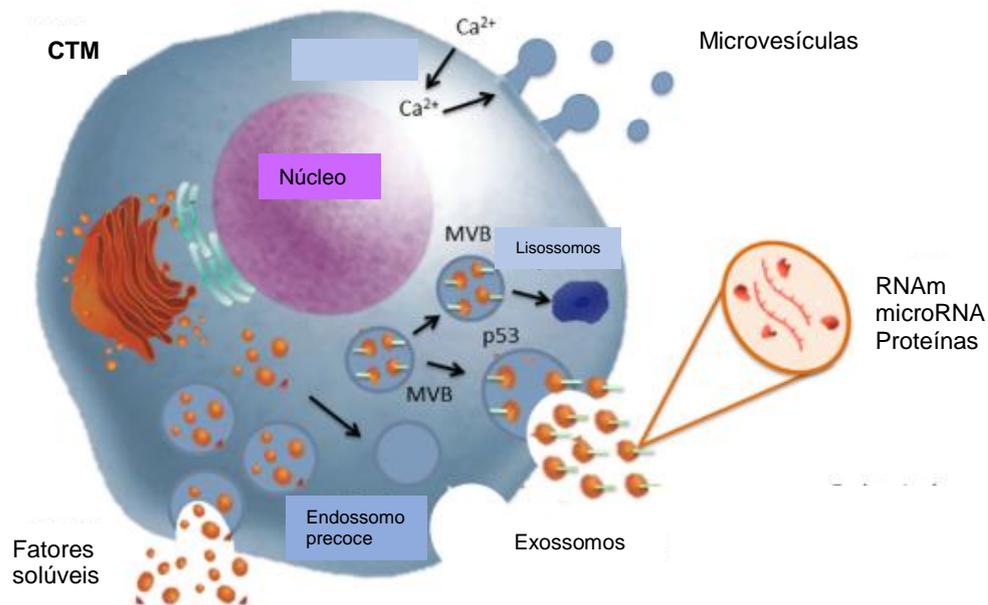
As CTM obtidas da MO possuem grande potencial para aplicação em terapias celulares e tem a capacidade de exercer um efeito terapêutico em uma ampla gama de doenças. Por sua habilidade imunomodulatória, podem promover mudança no curso pró-inflamatório da lesão. Tem sido demonstrado um grande potencial para uso clínico das CTM, devido ao fácil isolamento (aderência ao plástico de cultura) e por serem facilmente expandidas *in vitro*, sem que haja perda de fenótipo ou da capacidade de diferenciação. Além disso, outras propriedades tornam viáveis a sua utilização, como a sua baixa imunogenicidade, devido à ausência de expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e de moléculas co-estimulatórias em sua superfície. E também devido à ausência das controvérsias éticas, e pelo seu potencial de se diferenciar em outros tipos celulares (Ankrum & Karp, 2010; Mizukami & Swiech, 2018; Wise & Ricardo, 2012).

Terapia com Células-Tronco Mesenquimais

As CTM possuem a capacidade de migrar para regiões lesionadas, estimulando a investigação destas células para utilização na terapia celular. Para promover o reparo renal, as CTM atuam de diversos mecanismos, como incorporação destas células no tecido lesionado, diferenciação celular, fusão com células diferenciadas do tecido, estimulação endógena das CT residentes e secreção de fatores de crescimento e citocinas por ação parácrina e/ou endócrina (Asanuma et al., 2010; Spees et al., 2016). Porém, evidências crescentes têm mostrado que os efeitos benéficos das CTM mais promissores na reparação e regeneração tecidual se baseiam na ação parácrina. As CTM atuam de forma parácrina secretando fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, RNA mensageiro (RNAm) e microRNA que modulam as interações no microambiente e promovem a regeneração tecidual. O efeito parácrino é mediado por vesículas extracelulares (VE) liberadas pelas CTM, que são pequenos fragmentos esféricos de membrana chamados de exossomos e microvesículas. Os exossomos surgem de forma endocítica e são liberados pelas células por meio da fusão da

membrana plasmática, e podem medir cerca de 30 a 120nm, já as microvesículas são liberadas pelas células conforme o influxo de cálcio e a reorganização do citoesqueleto, medindo cerca de 100nm a 1µm (figura 10). Estes fatores secretados pelas CTM podem inibir a apoptose, estimular a proliferação celular, promover a vascularização e modular a resposta imune. Um estudo mostrou que o meio condicionado obtido a partir de uma cultura de CTM e utilizado para transplante, estimulou a migração celular, a proliferação das células epiteliais e redução da apoptose das células do túbulo proximal, restaurando a função renal nos ratos com nefrectomia 5/6 (Abreu et al., 2016; Nargesi et al., 2017; Van Koppen et al., 2012).

Figura 10 - Esquema representativo das células-tronco mesenquimais liberando as vesículas extracelulares



Nota: Esquema de uma célula-tronco mesenquimal liberando microvesículas por influxo de cálcio e reorganização do citoesqueleto e os exossomos liberados de forma endocítica. No esquema mostra que dentro das microvesículas e dos exossomos contém substâncias atuantes como, proteínas, microRNA e RNAm. MVB- corpos multivesicular.

Fonte: Adaptado de Abreu et al., 2016.

Além das CTM liberarem fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócito (HGF), fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1), os quais, respectivamente, estimulam a angiogênese, mitogênese e proliferação celular, estas células também promovem a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$), interferon gama ($INF-\gamma$) e interleucina 1 alfa ($IL-1\alpha$) (Borges et al., 2018; Kasten et al., 2012; Wise & Ricardo, 2012).

Alguns estudos experimentais em diferentes modelos de doença renal mostraram que o tratamento utilizando as CTM foram capazes de reverter os danos renais, tanto na fase aguda

quanto na fase crônica da doença. Mostrando que esses efeitos benéficos foram associados com o mecanismo de ação parácrina destas células, e não com a diferenciação em células renais (Morigi & De Coppi, 2014; Verdoorn et al., 2010). Em modelo de nefrectomia 5/6 em ratos foi observado redução da fibrose intersticial, da proteinúria e da creatinina sérica após o transplante de CTM na região subcapsular renal (Cavaglieri et al., 2009). Outro estudo, em modelo de obstrução ureteral unilateral (OUU) em ratos foi observado melhora na progressão da fibrose, na apoptose, na inflamação e na proliferação celular após o transplante de CTM administrada pela veia cava abdominal (Da Silva et al., 2015). Oliveira-Sales e colaboradores (2013) observaram o transplante de CTM promoveu melhora na função renal, redução das citocinas pró-inflamatórias e aumento da citocina anti-inflamatória no rim de ratos com hipertensão renovascular (Oliveira-Sales et al., 2013). Recentemente, o nosso grupo mostrou que após o transplante de CTM de medula óssea ocorreu restauração da expressão e atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, redução da fibrose e da apoptose e aumento da proliferação celular no rim de ratos com hipertensão renovascular em modelo 2R1C (Lira et al., 2017). Portanto, esses resultados mostram que as CTM são capazes de promover efeitos terapêuticos mediados pelos fatores secretados, como citocinas e fatores de crescimento, que auxiliam na criação de um microambiente apropriado para promover o reparo da lesão, pela estimulação parácrina/endócrina (Borges et al., 2018; Lindoso et al., 2014; Van Koppen et al., 2012; Wise & Ricardo, 2012).

De acordo com o site ClinicalTrials.gov (2018) existem 24 ensaios clínicos envolvendo a terapia com CTM em doenças renais, como nefropatia diabética, glomeruloesclerose focal e segmentar, lúpus eritematoso sistêmico e no transplante renal. Em um estudo com pacientes com doença renal policística observou-se redução dos níveis séricos de creatinina após o transplante autólogo de CTM de medula óssea depois de 12 meses de acompanhamento, sem efeitos adversos. Em um ensaio randomizado em pacientes com nefropatia diabética observou-se melhora na taxa de filtração glomerular (TFG) após três meses de tratamento alogênico com CTM. Outro estudo mostrou que o transplante intra-arterial de CTM autólogas em pacientes com doença renovascular permitiu o aumento da perfusão cortical e do fluxo sanguíneo renal e uma redução da hipóxia do tecido renal (Borges et al., 2018; Nargesi et al., 2017).

A capacidade das CTM de controlar o microambiente na lesão, promovendo a regeneração tecidual e recuperação da função, torna-se um grande interesse do avanço das pesquisas em diferentes modelos experimentais de lesão renal aguda e crônica (Sedrakyan et al., 2012; Verdoorn et al., 2010; Villanueva et al., 2011; Zhu et al., 2013). Porém, as vias de

administração destas células necessitam de padronização, pois a rota de entrega pode influenciar a migração e o destino final das CTM transplantadas. Recentemente, o nosso grupo observou presença das CTM GFP⁺ com maior frequência na região medular renal, próximo ao infiltrado de células inflamatórias e nas regiões de fibrose, comparado ao córtex renal após o transplante na região subcapsular renal em ratos com hipertensão renovascular. Portanto, foi sugerido que este transplante na região subcapsular permitiu um maior número de células no local da lesão para interagir por mais tempo com as células renais lesionadas, sintetizando e liberando fatores parácrinos, ocorrendo a reestruturação do parênquima renal e o restabelecimento da função renal (Lira et al., 2017).

Neste trabalho, utilizamos o transplante das CTM de medula óssea na região subcapsular para permitir um maior número de células no local da lesão, sem que haja necessidade de um estímulo local para migração das mesmas, como ocorre na via sistêmica. Dados da literatura mostraram que a terapia celular contribui significativamente para restauração da morfologia e da função renal em doenças renais. E esta restauração se deve ao remodelamento do parênquima renal, mas alguns mecanismos dos efeitos das CTM precisam ser melhor esclarecidos, na tentativa de impedir a progressão da fibrose na DRC.

1. OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar os efeitos do transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea na região subcapsular renal sobre o balanço das MMPs e TIMPs no rim de ratos com hipertensão renovascular.

1.2 Específicos

- a) Avaliar o efeito do transplante no controle da pressão arterial dos animais;
- b) Avaliar o efeito da terapia na função renal através da análise bioquímica de proteínas totais, creatinina e ureia séricas e proteinúria;
- c) Analisar o efeito do transplante das CTM na morfologia do parênquima renal através da coloração histológica de rotina Hematoxilina-Eosina;
- d) Analisar o efeito da terapia com CTM na fibrose no parênquima renal através da coloração de Picro Sirius Red (PSR);
- e) Estudar a melhora dos efeitos das CTM na integridade da membrana basal no parênquima renal através da coloração de Ácido Periódico-Schiff (PAS);
- f) Estudar os efeitos do transplante de CTM nos marcadores inflamatórios pela expressão de CD68 (macrófago), TNF- α , IL-10 e o marcador fibrótico pela α -SMA (alfa actina de musculo liso), no parênquima renal, por imuno-histoquímica;
- g) Analisar os efeitos da terapia com CTM no processo inflamatório e no remodelamento renal pela expressão de TNF- α , TGF- β , MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2, por western blotting.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

O protocolo de manuseio e experimentação dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (n.º CEUA/062/2012). Todos os experimentos utilizados com animais seguiram a regulamentação (Marques et al., 2009).

Os ratos *Wistar*, utilizados neste trabalho, foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia (IBRAG/UERJ), sob condições padrão de temperatura ($21\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade controlada ($60\pm 10\%$), com ciclo de claro e escuro de 12/12h e exaustão de ar a cada 15 min/hora. Os animais foram alimentados com ração padrão balanceada (NUVILAB®, Brasil) e água filtrada, ambos *ad libitum*.

2.2 Grupos experimentais

Ratos *Wistar* machos, com cerca de 2 meses de idade, foram divididos em 3 grupos experimentais. Na semana 0, foi realizada a cirurgia de clipagem da artéria renal esquerda para indução da hipertensão renovascular. Após 4 semanas da cirurgia de clipagem, os animais foram submetidos a um único transplante de CTM, na região subcapsular do rim esquerdo.

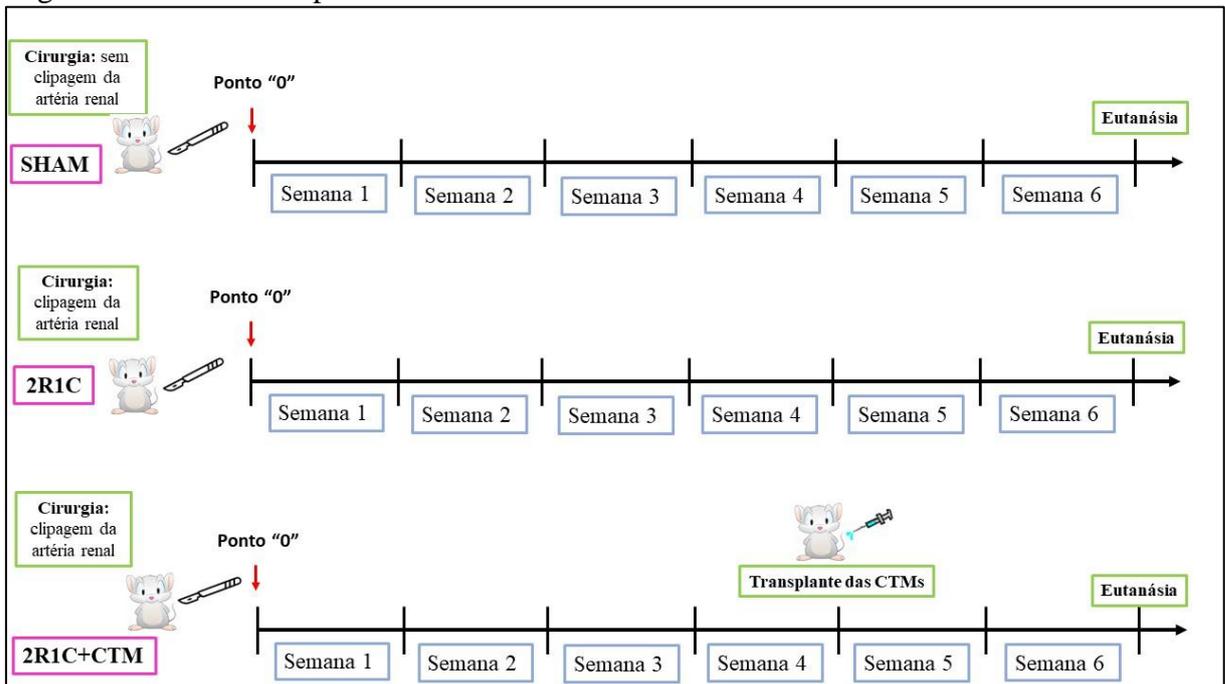
Grupos experimentais (n=6 em cada grupo):

Grupo Sham: animais controle, submetidos ao estresse da cirurgia, mas sem a colocação do clipe de prata na artéria renal esquerda, eutanasiados após 6 semanas.

Grupo 2R1C: animais submetidos à cirurgia com a colocação do clipe na artéria renal esquerda, eutanasiados após 6 semanas.

Grupo 2R1C+CTM: animais submetidos à cirurgia de clipagem da artéria renal esquerda, transplantados com CTM e eutanasiados após 6 semanas.

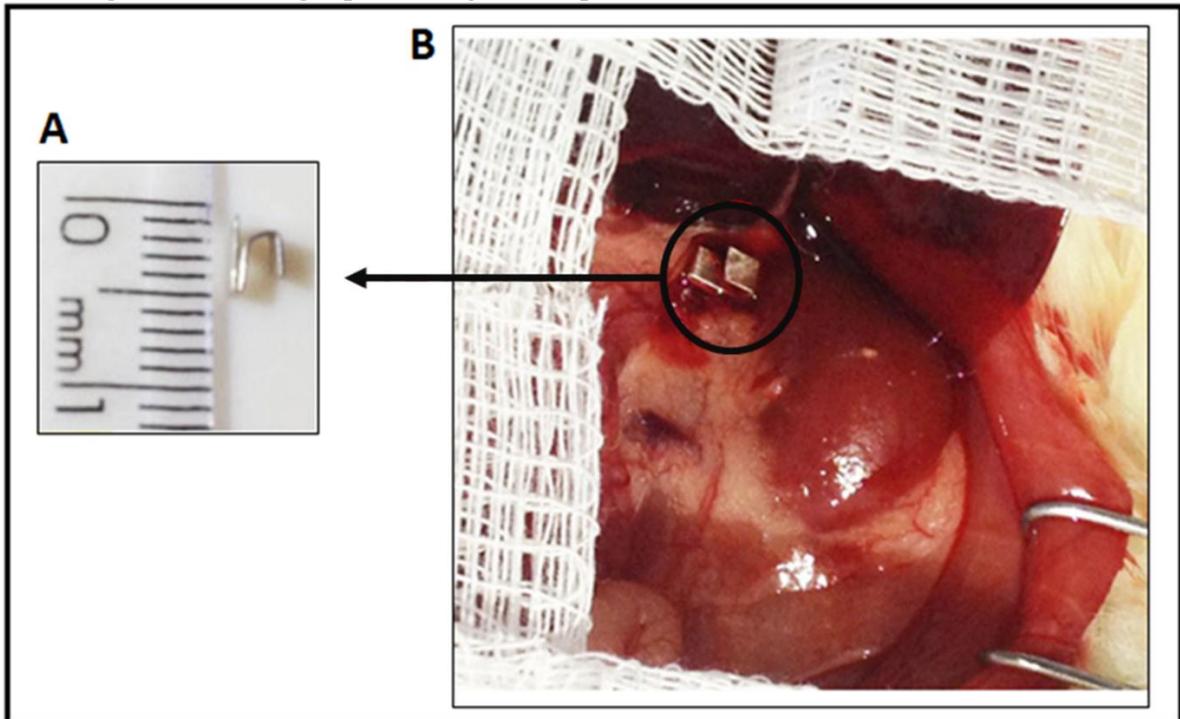
Figura 11 - Desenho experimental



2.3 Indução da hipertensão renovascular

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no Departamento de Histologia e Embriologia (IBRAG/UERJ). Neste trabalho foi aplicado o modelo de hipertensão renovascular descrito por Goldblatt -2R1C (Goldblatt et al., 1934). Ratos machos *Wistar* com cerca de 2 meses de idade foram anestesiados com Xilazina (Anasedan – 5 mg/kg) e Cetamina (Virbac – 100 mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada uma incisão cirúrgica no abdome do animal para localizar e dissociar a artéria renal esquerda do tecido conjuntivo e da veia renal. Posteriormente, foi colocado um clipe de prata com cerca de 0,2 mm de abertura (Figura 12), para induzir a oclusão parcial da artéria renal esquerda. Esta oclusão permite a redução do fluxo renal em aproximadamente de 50% (Campos et al., 2015), assim promovendo uma condição fundamental para desenvolver a hipertensão renovascular. Os animais do grupo sham foram submetidos ao procedimento cirúrgico, porém, sem oclusão parcial da artéria renal.

Figura 12 - Cirurgia para indução da hipertensão renovascular em ratos



Nota: A- Tamanho do clipe de prata com abertura de 0,2 mm, B- cirurgia de clipagem. Observa-se cirurgia com a implantação do clipe de prata na artéria renal esquerda.

Fonte: A autora, 2019.

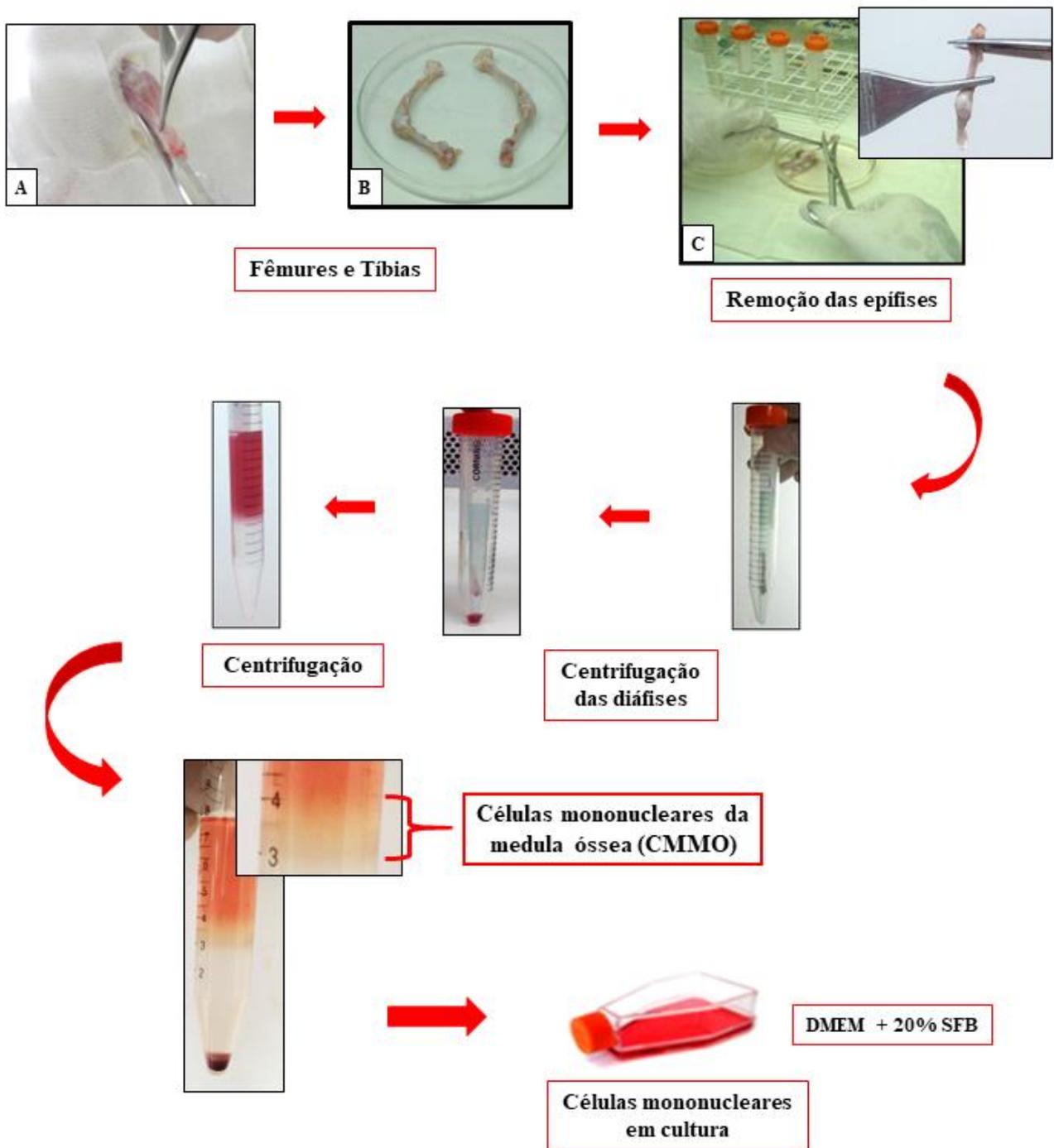
2.4 Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais de medula óssea

As células-tronco mesenquimais (CTM) de medula óssea foram obtidas a partir dos fêmures e tíbias de ratos machos *Wistar* com cerca de 2 meses de idade, eutanasiados em câmara de CO₂. Em seguida, foi realizada a assepsia nos membros inferiores com álcool 70% e, então, utilizando-se pinça e uma tesoura estéreis, a pele e os tecidos musculares no entorno do fêmur e da tíbia foram dissociados.

Na câmara de fluxo laminar, os fêmures e as tíbias foram colocados em placas de petri contendo PBS (tampão fosfato salino) para dissecação dos músculos e tendões. Então, as epífises ósseas foram cortadas para a exposição do conteúdo medular. As diáfises foram colocadas no interior de uma ponteira de 1000 µL, e esta, por sua vez, colocada dentro de um tubo falcon de 15 mL estéril. O material foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos à 4°C. O conteúdo medular foi resuspenso em PBS e novamente centrifugado por 1500 rpm a 5 minutos à 4°C. Os fragmentos ósseos e o sobrenadante foram descartados e o pellet do estroma medular foi ressuspenso em 4 mL de DMEM (Meio Eagle modificado por

Dulbecco, Sigma-Aldrich, pH 7.2) sem soro e sem antibiótico e, então, adicionado delicadamente sobre 4 mL de Ficoll (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich) no tubo falcon de 15 mL. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, na interface Ficoll e meio de cultura foi formado um anel de células mononucleares de medula óssea (CMMO), o qual foi coletado para um tubo falcon de 15 mL. Logo, as células foram ressuspendidas em 10 mL de PBS e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e esse processo de lavagem foi repetido por mais duas vezes até que o Ficoll fosse retirado totalmente (Lira et al., 2017). Em seguida, as células foram ressuspendidas em DMEM completo (DMEM + 20% de soro fetal bovino (SFB) + antibióticos [1% penicilina, garamicina e estreptomicina – Gibco] + 1% anfotericina B), plaqueadas em garrafas de cultivo de 25 cm² e mantidas em incubadoras a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Figura 13). Após 48 horas do plaqueamento, as células não aderentes foram retiradas e o meio de cultura foi renovado de 2 a 3 vezes por semana. Quando as CTM atingiram 80% de confluência, foram tripsinizadas com tripsina 0,25% e EDTA 0,2% (sal dissódico/ Sigma-Aldrich) e replaqueadas, caracterizando a primeira passagem (P1). Esse processo foi repetido até a terceira passagem (P3), onde as CTM estão no seu estado de maior rendimento e mais purificadas (figura 13).

Figura 13 - Isolamento de células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos



Nota: A- Retirada do fêmur e da tíbia. B- Dissecção do músculo. C- Retirada das epífises expondo o canal medular. Em seguida, foi realizado uma série de centrifugações obtendo o anel de células mononucleares de medula óssea (CMMO) plaqueadas em garrafas de cultura com DMEM completo.

Fonte: A autora, 2019.

2.5 Indução da diferenciação das células-tronco mesenquimais para caracterização

Para caracterização das CTM as células em P3 foram induzidas à diferenciação em linhagem adipogênica (Dominici et al., 2006; Mizukami & Swiech, 2018). As células foram plaqueadas em uma densidade de 10^5 por poço e mantidas com meio DMEM completo (DMEM + SFB 20% + 1% de penicilina, garamicina e estreptomicina + 1% anfotericina B) a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂, até atingir 80% de confluência. Em seguida, as células foram mantidas em meio de manutenção composto por DMEM com 10% SBF, 1% de penicilina, estreptomicina, guaramicina e anfotericina B, 2,5 µg/ mL de insulina bovina, 100 nM de dexametasona (Sigma-Aldrich). Para induzir a diferenciação em linhagem adipogênica, foi acrescentado ao meio de manutenção 100 µM de indometacina e 5 µM de rosiglitazona (Sigma-Aldrich). Desta forma, as células foram cultivadas por 3 dias no meio de indução e, em seguida, substituído pelo meio de manutenção por 24 horas, finalizando com 3 ciclos de troca de meios (18 dias). Após o termino dos ciclos, as células foram mantidas em meio de manutenção por 5 dias e, então, fixadas com paraformoldeído 4% por 1 hora e coradas com Oil Red por 5 minutos, para evidenciar vacúolos de gordura dos adipócitos. As células foram lavadas e coradas com hematoxilina por 30 segundos e, então, observadas ao microscópio de luz.

2.6 Caracterização das células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo

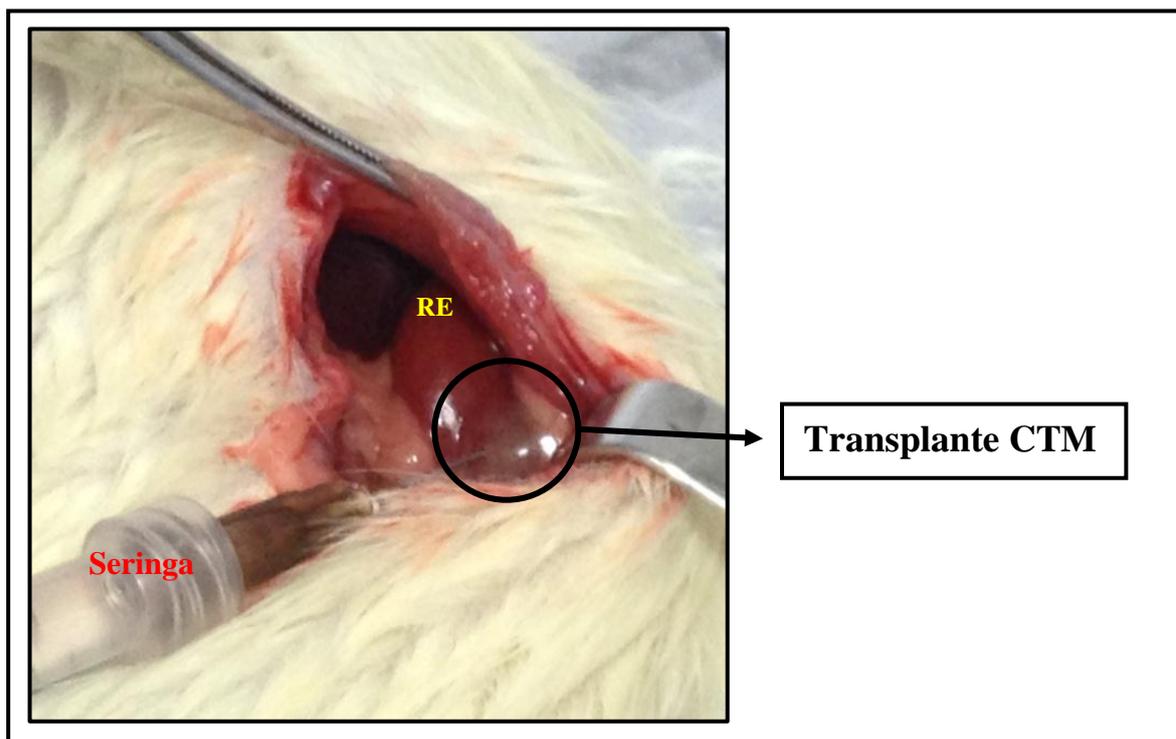
Após as CTM atingirem 90% de confluência na terceira passagem, foram tripsinizadas utilizando tripsina-EDTA 0,25%. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 5 mL de PBS. Este processo foi realizado três vezes e o pellet de células ressuspensionado em PBS gelado. Cerca de 10^5 células ressuspensionadas em 100 µL foram incubadas com anticorpos anti-CD105-PE (Abcam) e anti-cKIT-APC (Abcam), em diluição 1:20, por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e a análise da fluorescência foi realizada no citômetro de fluxo (BD Accuri, BD Biosciences). As análises dos resultados foram realizadas pelo software BD CSampler.

2.7 Transplante das CTM na região subcapsular do rim

As CTM em P3 foram incubadas com Accutase (Sigma-Aldrich) por 5 minutos a 37°C para a remoção das garrafas de cultura. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C, lavadas 2 vezes com PBS e contadas na câmara de Neubauer. Seringas de 1 ml foram preparadas com 1×10^6 células diluídas em 0,5 mL de PBS gelado.

Os ratos do grupo 2R1C+CTM, após 4 semanas da cirurgia de clipagem, foram anestesiados com Xilazina (5 mg/kg) e Cetamina (100 mg/kg) intraperitoneal e as células foram injetadas na região subcapsular do rim (Figura 14).

Figura 14 - Transplante das CTM na região subcapsular renal dos animais do grupo 2R1C+CTM.



Nota: RE- rim esquerdo. Observa-se formação de uma bolha acima do rim esquerdo no momento da injeção, referente as células (círculo preto) que serão absorvidas pelo parênquima renal.

Fonte: A autora, 2019

2.8 Pressão arterial

A aferição da pressão arterial sistólica (mmHg) dos animais foi realizada pelo método não invasivo de pletismografia de cauda (Letica LE 5100 – Pantalab ®, Espanha). Este

procedimento consiste em oclusão da artéria da cauda com auxílio de um pequeno “*cuff*”, além de um sensor que também é colocado na cauda do animal. Este sensor detecta a pulsação arterial e envia o sinal para um conversor analógico digital. A aferição da pressão arterial foi realizada semanalmente, dando o início na semana anterior a cirurgia da clipagem da arterial renal esquerda (2R1C, 2R1C+CTM) e anterior a cirurgia de estresse nos animais Sham até a semana 6, onde ocorreu a eutanásia dos animais. Foram realizadas cinco medições repetidas para cada animal dos diferentes grupos experimentais, com intuito de obter uma média final dos valores.

Para evitar que houvesse influência do estresse induzido pela manipulação do animal no período da aferição da pressão arterial, os animais foram adaptados previamente por duas semanas antes do início do período experimental.

2.9 Dosagem bioquímica sérica e urinária

Na última semana experimental, os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24h, com livre acesso à água filtrada e ração. Após a coleta, a urina foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos e congelada para análise posterior. No mesmo dia, os animais foram anestesiados com Xilazina (5mg/kg) e Cetamina (100mg/kg) intraperitonealmente. As amostras de sangue foram obtidas pela punção cardíaca e adicionadas em tubo falcon com heparina (anticoagulante). Logo após, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente, o plasma foi retirado e acondicionado a -20°C para análise bioquímica posterior.

A fim de avaliar a função renal, foram analisados os níveis séricos de creatinina, uréia e proteínas totais e o nível urinário de proteínas.

2.10 Quantificação da creatinina e da ureia no plasma

As concentrações séricas da ureia e da creatinina foram dosadas pelo kit comercial da Bioclin (Ureia cinética – K056 e Creatinina cinética – K067) para leitura no espectrofotômetro (A25, BioSystems) em 340nm e 510nm, respectivamente, aos 30 e 90 segundos.

A técnica da quantificação da ureia se baseia na oxidação de NADH por NAD⁺. Durante a reação, a redução da absorbância é proporcional à concentração de ureia na amostra. A partir dos valores de absorbância de cada amostra, calculamos o valor da ureia no plasma de acordo com a fórmula abaixo:

$$\Delta A \text{ do Padrão} = \text{Abs. 90 segundos} - \text{Abs. 30 segundos}$$

ou da Amostra

$$\text{Uréia (mg/dL)} = \frac{\Delta A \text{ da Amostra}}{\Delta A \text{ do Padrão}} \times 70$$

No caso da creatinina, a técnica está baseada na reação da creatinina com o picrato alcalino em meio tamponado, surgindo um cromógeno cuja absorbância é proporcional à concentração de creatinina na amostra. A partir dos valores de absorbância de cada amostra, calculamos o valor da creatinina sérica de acordo com a fórmula abaixo:

$$\Delta A \text{ do Padrão} = \text{Abs. 90 segundos} - \text{Abs. 30 segundos}$$

ou da Amostra

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = \frac{\Delta A \text{ da Amostra} \times \text{Concentração do Padrão (3mg/dL)}}{\Delta A \text{ do Padrão}}$$

Os dados foram utilizados para construção dos gráficos de concentração da ureia e creatinina pelo software Graph Pad Prisma 6.0.

2.11 Quantificação das proteínas totais plasmática e urinária

As concentrações das proteínas totais séricas e da urina de 24 horas foram realizadas com o uso dos kits comerciais da Bioclin (Proteínas totais - K031 e Bioprot U/LCR – K108) para leitura no espectrofotômetro (A25, BioSystems) em 545nm e 600nm, respectivamente.

A quantificação das proteínas séricas totais foi realizada pelo método de biureto, onde há uma reação entre as ligações peptídicas das proteínas com os íons cúpricos, em pH alcalino, surgindo um complexo de cor violeta, sendo proporcional à concentração de proteínas na amostra.

Já a quantificação das proteínas presentes na urina ocorre com a reação com vermelho de Pírogalol e o Molibdato, surgindo um complexo de cor vermelha, sendo a intensidade de cor

formada diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra. A partir dos valores de absorvância de cada amostra, calculamos os valores das proteínas totais séricas e urinária de acordo com as fórmulas abaixo:

<p>Determinação da concentração de proteínas totais no plasma:</p> $\text{Proteínas Totais (g/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 4$ <p>Determinação da concentração de proteínas totais na urina:</p> $\text{Proteína (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 65$
--

Os dados foram utilizados para construção dos gráficos de concentração das proteínas totais plasmática e urinária pelo software Graph Pad Prisma 6.0.

2.12 Processamento do tecido renal para análise na microscopia de luz

Após os animais serem eutanasiados, na semana 6, os rins foram coletados e fixados em formol 10% tamponado por 3 dias, em seguida, foram lavados em água corrente por 1h e desidratados em álcool 70% “overnight”. No outro dia, foi dado continuidade ao procedimento de desidratação em álcool a 90% e dois banhos em álcool 100%, por 1h cada. A clarificação foi realizada em duas séries de xilol por 30 minutos cada, seguida de imersão em dois banhos de parafina por 40 minutos cada e, finalmente, a inclusão em parafina. Após a microtomia dos blocos, os cortes de 5 µm foram aderidos em lâminas silanizadas.

Posteriormente, as lâminas com os cortes permaneceram na estufa a 58°C por 5 minutos, depois foram desparafinizadas por 3 banhos de xilol por 3 minutos, reidratadas por concentrações decrescente de álcool (100%, 90%, 70%) durante 3 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram coradas por Hematoxilina e Eosina, desidratadas com concentrações crescente de álcool (70%, 90%, 100%), clarificadas com 3 banhos em xilol por 2 minutos cada. As lâminas foram montadas com entelan e analisadas ao microscópio de luz para verificação de alterações histológicas. As imagens foram capturadas ao microscópio de luz pelo software Image-Pro Plus 7.0.

2.13 Análise qualitativa e quantitativa de colágeno por Picro Sirius Red

Para análise de depósito de colágeno, as lâminas contendo os cortes histológicos foram colocadas na estufa a 60°C por 30 minutos. Em seguida, essas lâminas foram desparafinizadas e clarificadas em 3 banhos de xilol, hidratadas em banhos seguidos de concentrações decrescente de álcool (100%, 90%, 70%) durante 2 minutos cada. Os cortes foram corados com Picro Sirius Red (solução de 0,1% de Direct Red 80, Sigma-Aldrich) por 1 hora, banhados em solução de HCl 0,1N por 2 minutos e lavados com água destilada. Em seguida, o tecido foi contracorado com hematoxilina e desidratado com concentrações crescente de álcool (70%, 90%, 100%) por 3 minutos cada. Por fim, os cortes foram clarificados com 3 banhos de xilol e montadas com entellan (Merck).

Para quantificação do colágeno por Picro Sirius Red, foram necessárias três lâminas de cada animal. As áreas coradas em vermelho nas imagens, consideradas como fibrose pelo acúmulo excessivo de colágeno, foram capturadas ao microscópio de luz com objetiva de 40x (8 campos aleatórios de cada lâmina, total de 120 campos analisados por grupo experimental). A quantificação foi realizada pelo software Image-Pro Plus 7.0 e a análise estatística pelo programa Graph Pad Prisma 5. Os resultados foram expressos por porcentagem de área corada. As imagens também foram capturadas ao microscópio de luz polarizada, com finalidade de confirmar o depósito de colágeno.

2.14 Coloração de PAS (Ácido Periódico-Schiff)

Para verificar a integridade da membrana basal, os cortes histológicos foram colocados na estufa a 60°C por 5 minutos e, em seguida, submetidos à desparafinação com 3 banhos de xilol e hidratadas com 3 banhos de álcool com concentração decrescente (100%, 90%, 70%) por 2 minutos cada. Os cortes foram imersos em solução de ácido periódico a 5% por 5 minutos e, posteriormente, lavados com água destilada. Em seguida, os cortes foram corados com o Reativo de Schiff durante 10 minutos. Estes cortes foram lavados em água corrente e com água destilada e, em seguida, os núcleos das células foram corados com hematoxilina por 40 segundos e lavados com água destilada. Logo, os cortes foram desidratados com

concentração crescente de álcool (70%, 90%, 100%) e clarificados com 3 banhos de xilol e as lâminas foram montadas com entellan (Merk).

2.15 Imunohistoquímica

Inicialmente, as lâminas com os cortes de rim foram colocadas na estufa a 60°C por 5 minutos. Em seguida, os cortes sofreram desparafinação por 3 banhos seguidos de xilol e hidratação por concentrações decrescente de álcool (100%, 90%, 70%) por 2 minutos cada. As lâminas foram lavadas com água destilada e, na câmara úmida, os cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio por 15 minutos, no intuito de esgotar a peroxidase endógena. Os cortes foram lavados com PBS (pH 7,6) três vezes e, a seguir, incubados com tampão citrato, pH 6,0 a 60°C, por 20 minutos, para promover a recuperação dos sítios antigênicos. Depois de três lavagens com PBS (pH 7,6), os cortes foram incubados com bloqueio 2,5% (Kit-Vector) por 20 minutos, com objetivo de bloquear reações inespecíficas com o anticorpo primário. Na sequência, os cortes foram incubados com o anticorpo primário policlonal de interesse - anti-CD68 (1:200, Biogenesis), anti- α SMA (1:200, Biorbyt), anti-IL-10 (1:100, Biorbyt) e anti-TNF- α (1:100, Santa Cruz), diluído em PBS/BSA 1% *overnight*.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS (pH 7,6) e incubadas com anticorpo secundário biotilado por 10 minutos e depois lavadas. Os cortes foram incubados com estreptavidina-peroxidase por 5 minutos e lavados com PBS e, em seguida, incubados com DAB por um período de exposição de 40-60 segundos e lavados novamente em água destilada por 2 minutos. Para corar os núcleos das células, as lâminas foram coradas pela hematoxilina e, a seguir, foram desidratadas com concentrações crescentes de álcool (70%, 90%, 100%), clarificadas com 3 banhos de xilol e montadas com entellan (Merk).

As quantificações das imagens das marcações de CD68 (macrófago) e de α -SMA (miofibroblasto) foram obtidas por meio de contagem de pontos de área marcada de cor castanho (pixels/ μm^2) com objetiva de 40x (cinco lâminas de cada grupo experimental e vinte campos aleatórios de cada lâmina, totalizando 100 campos analisados por grupo). As imagens foram capturadas ao microscópio de luz e a quantificação foi realizada pelo software Image-Pro Plus 7.0. A análise estatística foi pelo programa Graph Pad Prisma 5.

2.16 Western Blotting

Fragmentos de rim (100 mg) dos grupos experimentais foram lisados em tampão de Lise contendo 1% de triton x-100, Tris 50mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio, cloreto de sódio 150mM, 0,1% SDS, fluoreto de sódio 50 mM, ortovanadato de sódio 1mM e 1µg/mL de coquetel inibidor de protease (Roche). Os fragmentos foram homogeneizados no aparelho turrax (Ika-Labortechnik) e, após centrifugação a 10.000 rpm por 30 min, a 4°C, os sobrenadantes foram coletados. As concentrações protéicas das amostras foram quantificadas através de kit específico (BCA Protein Assay Reagent, Thermo Scientific) com auxílio de leitor de Elisa e comprimento de onda 540nm (TU-1800 UV-VIS). Em seguida, as amostras foram aliqüotadas e o tampão de amostra (Tris-HCl 50mM, pH 6,8. SDS 1%, 2-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%) adicionado para desnaturar as proteínas a uma temperatura de 100 °C por 5 minutos. Até no momento da análise, as amostras foram mantidas a -20°C.

As proteínas totais (40µg para as análises de MMP-2, MMP-9 e 100µg para as análises de TIMP-1, TIMP-2, TGF-β, TNFα) foram separadas em gel de poliacrilamida a 10% e 12%, respectivamente por 1h a 150V. O padrão de peso molecular correu em paralelo a separação das proteínas por eletroforese para estimar o peso molecular da amostra (GE Healthcare).

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Bio-Rad) por 1h a 15V, utilizando o sistema semidry (Bio-Rad). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 1h com leite Molico a 5% em Tween-TBS (Tris-HCl 20mM, pH 7,5, NaCl 0,5mM, Tween-20 0,05%). Logo a seguir, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo primário policlonal anti- MMP-2 (rabbit - 1:500), anti-MMP-9 (rabbit - 1:500), anti- TIMP-1 (goat - 1:500), anti- TIMP-2 (goat - 1:500), anti-TNF-α (goat- 1:200), anti-TGF-β (rabbit - 1:200), e anti- β-actina (rabbit - 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology) diluído em T-TBS com 1% de leite Molico. Em seguida, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com anticorpo secundário biotilado correspondente (Zymax) 1:5000 (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, TNF-α, TGF-β) e 1:10000 (β-actina) diluído em T-TBS com 1% de leite Molico por 1h. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com estreptavidina-peroxidase (Invitrogen) 1:5000 (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, TNF-α, TGF-β) e 1:10000 (β-actina) em T-TBS com leite Molico a 1% por 1h.

Para a detecção das bandas, foi utilizado o kit de revelação por quimioluminescência (ECL, GE Healthcare Amersham), incubando a membrana por 1 minuto ao abrigo de luz. As

imagens das bandas de proteínas foram capturadas pelo ChemiDoc*MP (Bio-Rad) e a análise das bandas foi realizada por densitometria no Photoshop Elements 9 e os dados estatísticas foram realizadas no Graph Pad Prisma.

2.17 Análise estatística

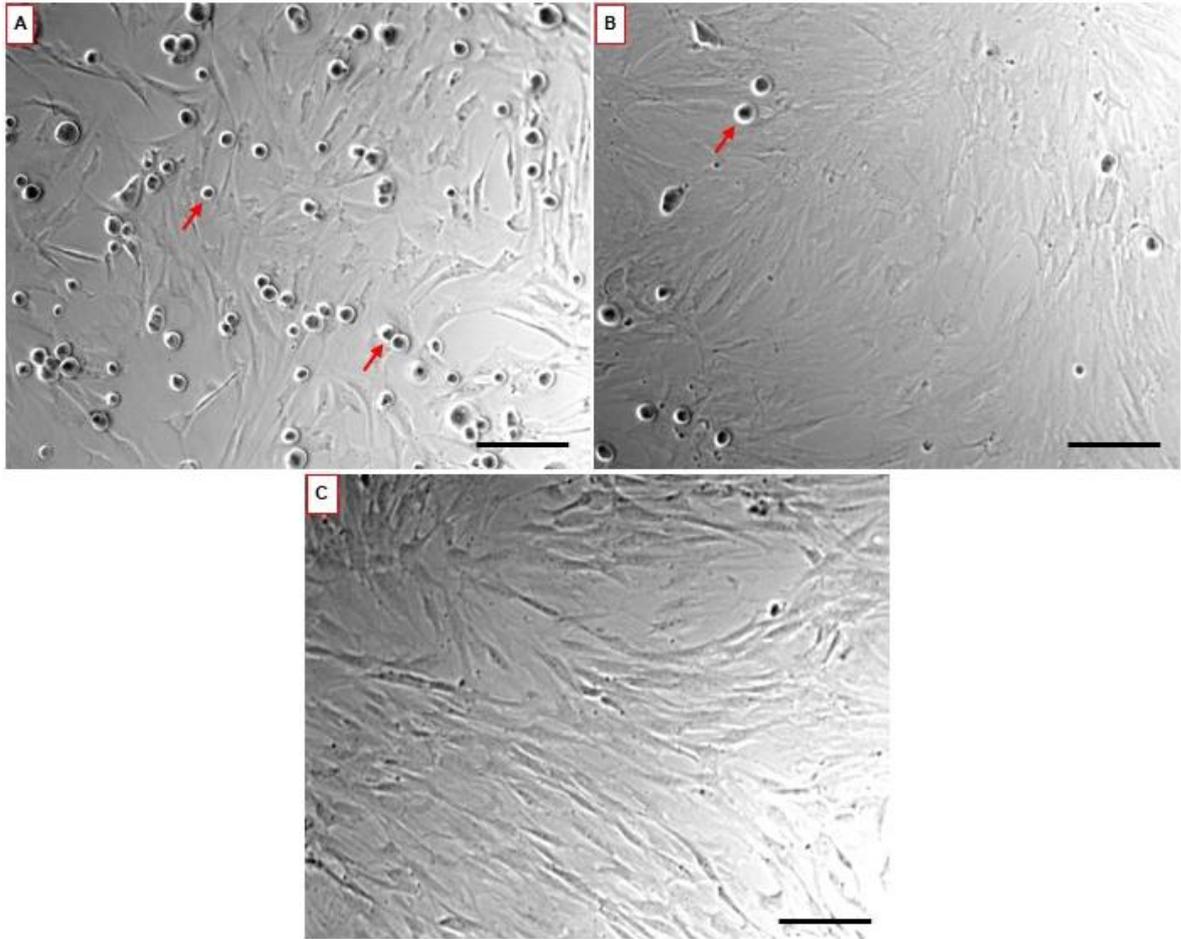
Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. Os parâmetros foram analisados estatisticamente pelo teste one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, com exceção da pressão arterial que foi analisada por two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, ambos pelo software Graph Pad Prism 6, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Cultura de células-tronco mesenquimais da medula óssea

As células mononucleares da medula óssea, obtidas pela diferença de gradiente de densidade (Ficoll) após a centrifugação, foram cultivadas em garrafas de cultura. Durante o cultivo foi possível observar a presença de duas populações celulares, as CTH e CTM, que se distinguiram pela adesão ao plástico da garrafa de cultura. As células não aderentes, exemplo das CTH, foram removidas pelo procedimento de troca de meio e passagem enzimática. Nas imagens, observamos na P1 a presença de células arredondadas e fusiformes (Figura 15A). Já na P2, houve uma expansão das células fusiformes, com aspecto semelhante ao fibroblasto, (Figura 15B). Após três passagens enzimáticas, observamos uma cultura mais expandida e purificada de células fusiforme, característica das CTM (Figura 15C).

Figura 15 - Microscopia de luz com contraste de fase mostrando a morfologia das CTM em cultura



Nota: A- células em cultura na primeira passagem (P1), B- células em cultura na segunda passagem (P2) e C- células em cultura da terceira passagem (P3). Observamos em P1 (A) e P2 (B) a presença de células arredondadas (células hematopoiéticas – seta) e fusiforme. Em P3 (C), foram observadas somente células fusiformes. Objetiva de 10x. Barra de calibração 25 μ m. Microscopia de contraste de fase.

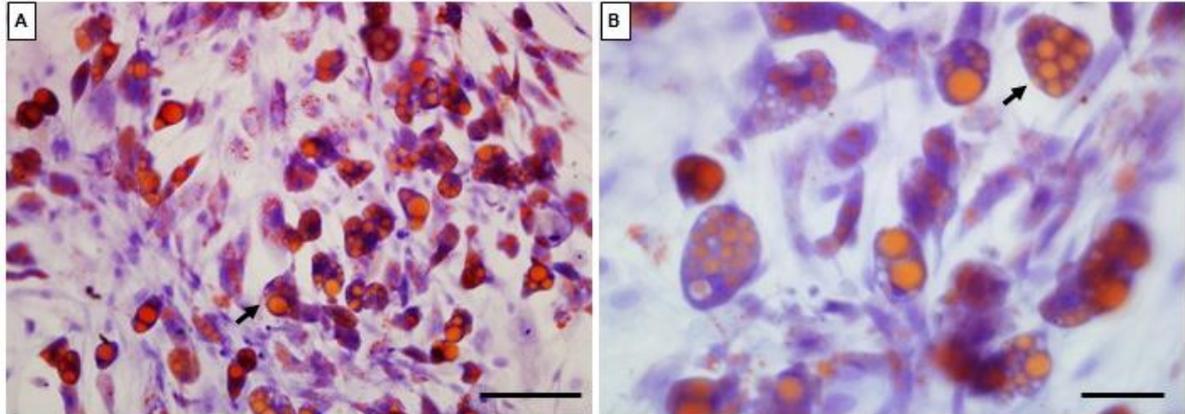
Fonte: A autora, 2019

3.2 Diferenciação das células-tronco mesenquimais em linhagem adipogênica (*in vitro*)

Realizamos o protocolo de diferenciação em linhagem adipogênica, no qual as células foram mantidas em condições e estímulos específicos durante 18 dias. Um dos critérios de classificação das CTM, segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC), é a capacidade de diferenciação em linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. Após 18

dias de estímulo, as células apresentaram várias gotículas contendo lipídeos corados com Oil Red (vermelho) em seu citoplasma, característico de um adipócito (figura 16).

Figura 16 - Diferenciação das células-tronco mesenquimais em linhagem adipogênica



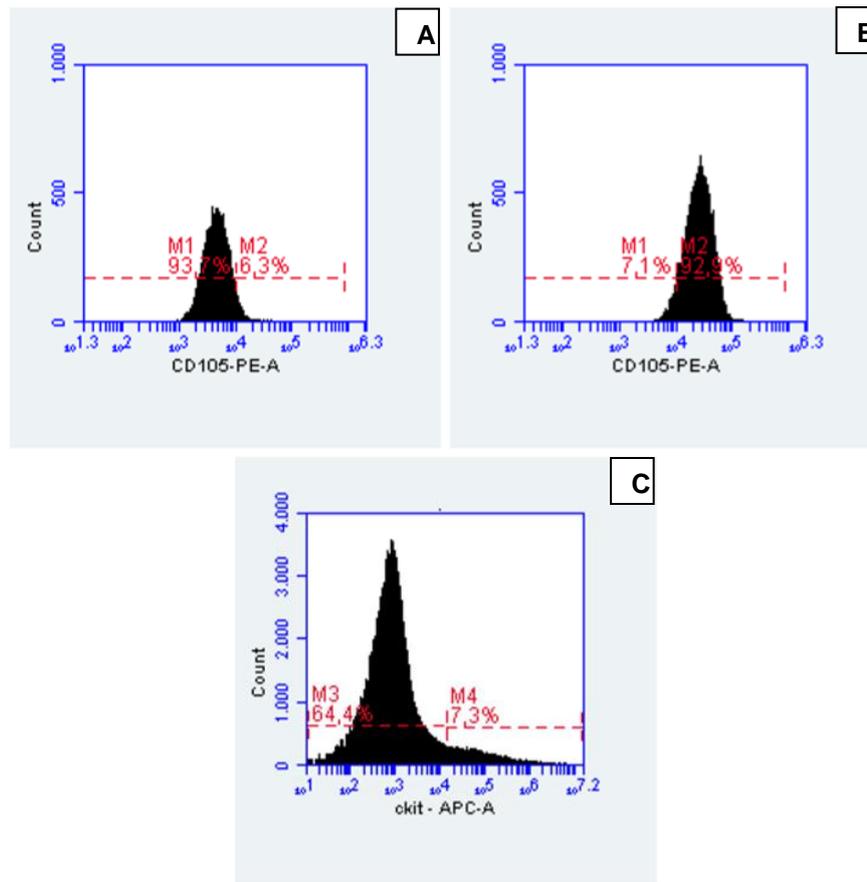
Nota: A- Objetiva de 20x e B- objetiva de 40x. Células diferenciadas em adipócitos com presença de gotículas lipídicas (seta) mostrados pela coloração Oil Red. Barra de calibração 15 μ m e 5 μ m.

Fonte: A autora, 2019

3.3 Caracterização das CTM por citometria de fluxo

A caracterização das CTM por outro critério estabelecido pela SITC é a presença ou ausência de marcadores de superfície específicos, como CD105 (considerado marcador positivo, CD105⁺) e c-Kit (considerado marcador negativo, c-kit⁻). Podemos observar que o gráfico de histograma do controle (figura 17A) foi posicionado o marcador no intuito de excluir células que não apresentavam marcação específica. No histograma B observamos que as células em P3 apresentaram alta expressão de CD105, aproximadamente 92%, e pouca expressão de c-kit no histograma C, indicando que a cultura na terceira passagem estava muito purificada com CTM.

Figura 17 - Gráficos de histograma representativos da citometria de fluxo



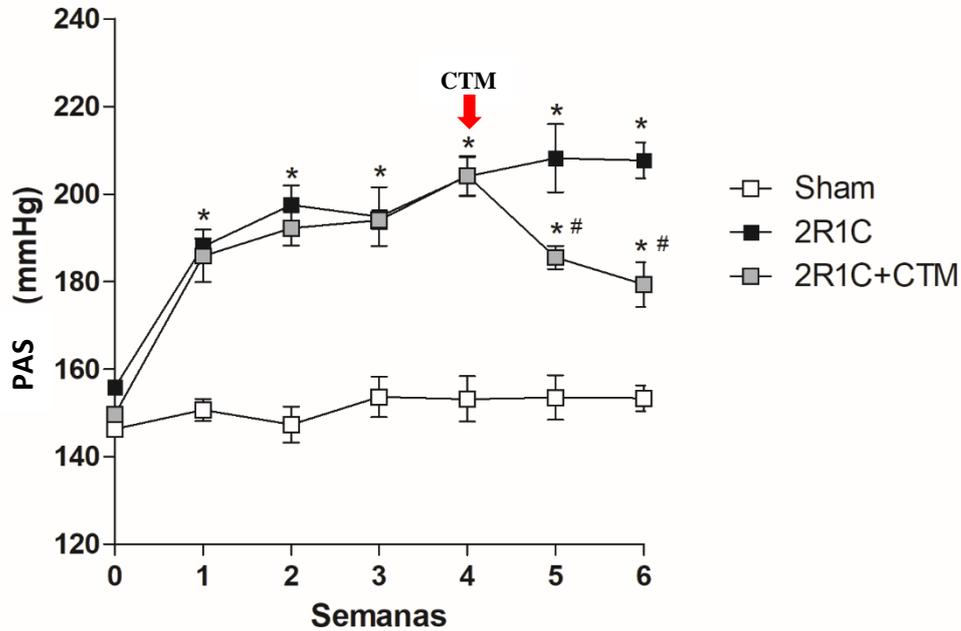
Nota: A- controle com ausência de fluorescência; B- Histograma de FL1 (CD105-PE) mostrando que 92% das células expressaram marcador CD105 na P3; C- Histograma de FL4 (c-Kit-APC). Análises dos resultados foram realizadas pelo BD CSampler software.

Fonte: A autora, 2019.

3.4 Avaliação da pressão arterial

Antes da cirurgia da clipagem da artéria renal todos os animais, dos três grupos experimentais, apresentaram a pressão arterial em níveis semelhantes. Após a oclusão parcial da artéria renal esquerda dos animais 2R1C, ocorreu elevação da pressão arterial sistólica (PAS) a partir da primeira semana (155 ± 4 para 188 ± 5 mmHg), que se manteve elevada até o final do período experimental comparado ao grupo Sham (208 ± 10 mmHg vs. 152 ± 5 mmHg) (figura 18 e tabela 01). No grupo 2R1C transplantado com CTM, a PAS reduziu significativamente após 4 semanas em comparação ao grupo 2R1C (174 ± 6 mmHg vs. 208 ± 10 mmHg). Porém, a pressão arterial do grupo 2R1C+CTM não voltou aos níveis observados do grupo Sham.

Figura 18 - Avaliação do progresso da pressão arterial nos grupos experimentais



Nota: O gráfico apresenta os valores da pressão arterial sistólica (PAS) aferida semanalmente pelo método da pletismografia (Letica LE 5100, Pantalab ®), por sete semanas nos grupos sham, clipado (2R1C), e clipado tratado com CTM (2R1C + CTM). Valores expressos com média \pm erro padrão, n=6 animais por grupo. $p \leq 0,05$, * diferença significativa em relação ao grupo Sham, # diferença significativa em relação ao grupo 2R1C.

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 1 - Progressão da pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos experimentais

Pressão Arterial Sistólica (mmHg)			
Semanas	Sham	2R1C	2R1C+CTM
0	146 \pm 4	155 \pm 4	150 \pm 4
1	150 \pm 5	188 \pm 4	185 \pm 8
2	147 \pm 6	198 \pm 10	192 \pm 9
3	153 \pm 8	195 \pm 11	194 \pm 5
4	153 \pm 8	204 \pm 10	205 \pm 10
5	150 \pm 6	208 \pm 12	187 \pm 5
6	152 \pm 5	208 \pm 10	174 \pm 6

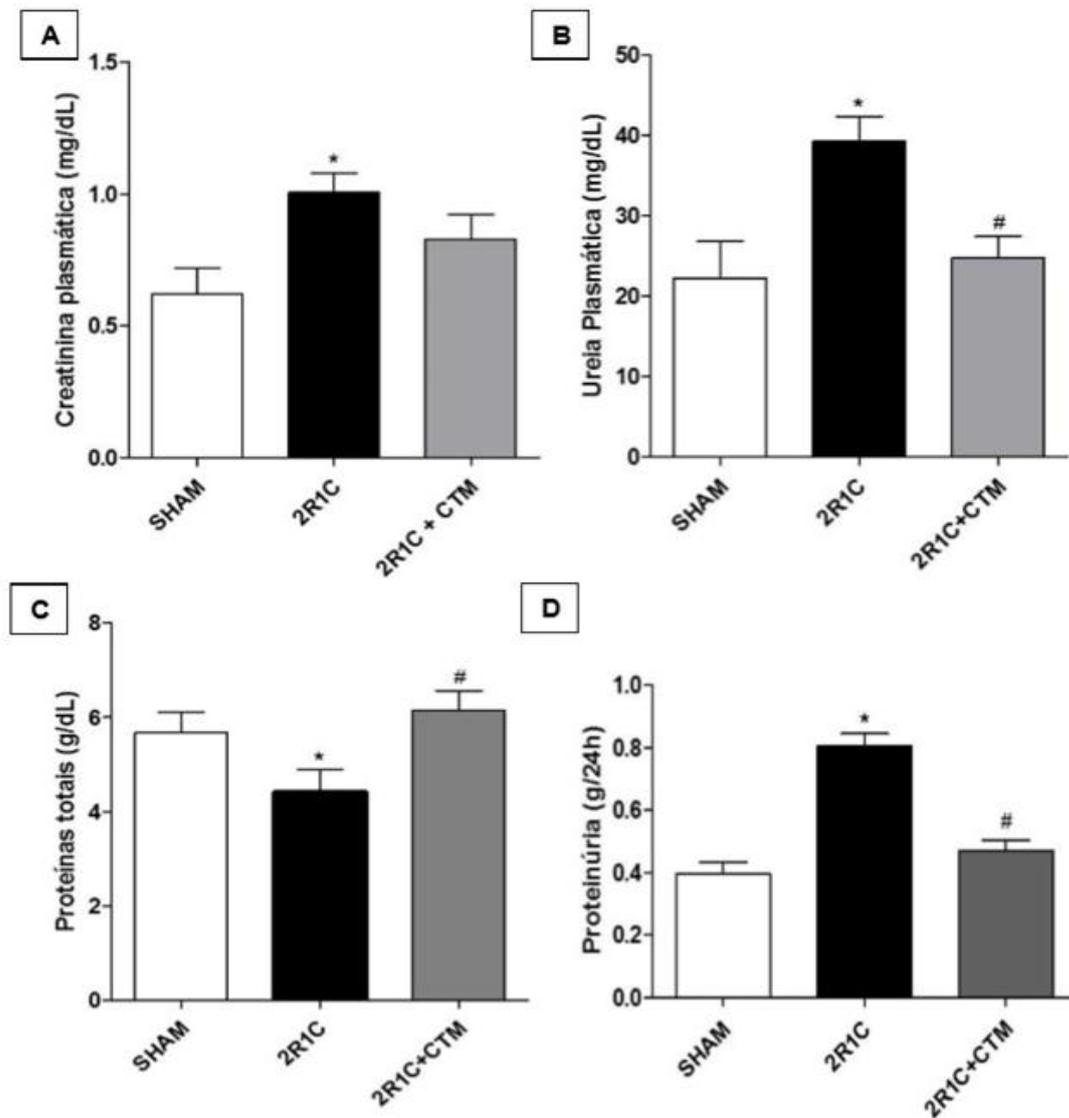
Nota: Progressão da pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos experimentais por um período de 7 semanas. Na quarta semana foi realizado o transplante das CTM no grupo 2R1C+CTM. Valores com média \pm Erro Padrão.

Fonte: A autora, 2019

3.5 Avaliação das dosagens séricas de creatinina, uréia, proteínas totais e proteinúria

Na última semana experimental (semana 6), as amostras séricas foram analisadas para creatinina, ureia e proteínas totais. Tanto os níveis de creatinina ($1,01 \pm 0,073$ vs. $0,62 \pm 0,097$ mg/dL), quanto de ureia ($39,25 \pm 3,13$ vs. $22,25 \pm 4,56$ mg/dL), apresentaram-se elevados no grupo 2R1C em comparação ao sham, apontando um dano na função renal. Já os níveis de proteínas totais séricas no grupo com hipertensão renovascular (2R1C) apresentou redução em relação aos animais do grupo sham ($4,41 \pm 0,2$ vs. $5,67 \pm 0,1$ g/dL). A dosagem de proteína na urina de 24h demonstrou aumento dos níveis de proteinúria nos animais do grupo 2R1C em comparação ao grupo sham ($0,81 \pm 0,02$ vs. $0,39 \pm 0,02$ g/24h), apontando um quadro de proteinúria característico da doença renal crônica. O transplante de CTM promoveu redução da ureia plasmática ($24,72 \pm 2,72$ mg/dL) em comparação ao grupo 2R1C e tendência de redução nos níveis de creatinina ($0,83 \pm 0,094$ mg/dL) (Figura 19A, B). O transplante também promoveu aumento dos níveis de proteínas séricas ($6,15 \pm 0,1$ g/dL) (Figura 19C) enquanto o quadro de proteinúria foi reduzido, semelhante ao grupo sham ($0,47 \pm 0,02$ vs. $0,39 \pm 0,02$ g/24h) (Figura 19D).

Figura 19 - Avaliação da função renal pelas dosagens bioquímicas



Nota: Níveis séricos de A- creatinina, B- ureia, C- proteínas totais e D- proteinúria avaliados na última semana experimental. Valores expressos como média \pm erro padrão, n=6 para todos os grupos. $P \leq 0,05$ * diferença significativa com relação ao grupo controle, # diferença significativa com relação ao grupo 2R1C. Analisado pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

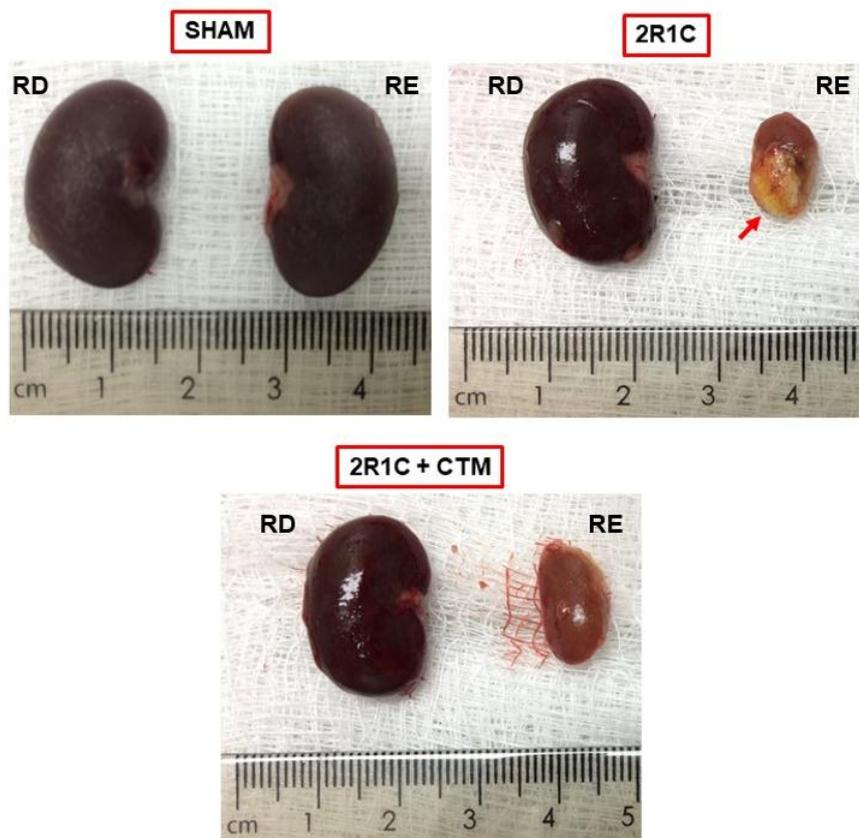
Fonte: A autora, 2019.

3.6 Análise macroscópica dos rins nos diferentes grupos experimentais

Os animais do grupo sham apresentaram parênquima renal preservado em ambos os rins, direito e esquerdo. Entretanto, os animais submetidos à clipagem da artéria renal esquerda (2R1C), sofreram redução da perfusão no rim esquerdo, promovendo isquemia e consequente atrofia deste rim. Além disso, o rim esquerdo apresentou extensa região de fibrose,

evidenciada pela coloração externa amarelada (seta vermelha), enquanto que o rim contralateral (direito), apresentou hipertrofia em relação ao rim dos animais do grupo sham. Após o transplante de CTM (2R1C+CTM), observamos atrofia no rim esquerdo (clipado), porém a extensão da fibrose, apresentando parênquima renal mais preservado.

Figura 20 - Análise macroscópica dos rins direito e esquerdo dos grupos Sham, 2R1C e 2R1C+CTM



Nota: RD- rim direito, RE- rim esquerdo. O rim esquerdo do grupo 2R1C apresenta-se atrofiado e com área de fibrose (seta vermelha). O grupo 2R1C+CTM o rim esquerdo encontra-se com parênquima mais preservado.

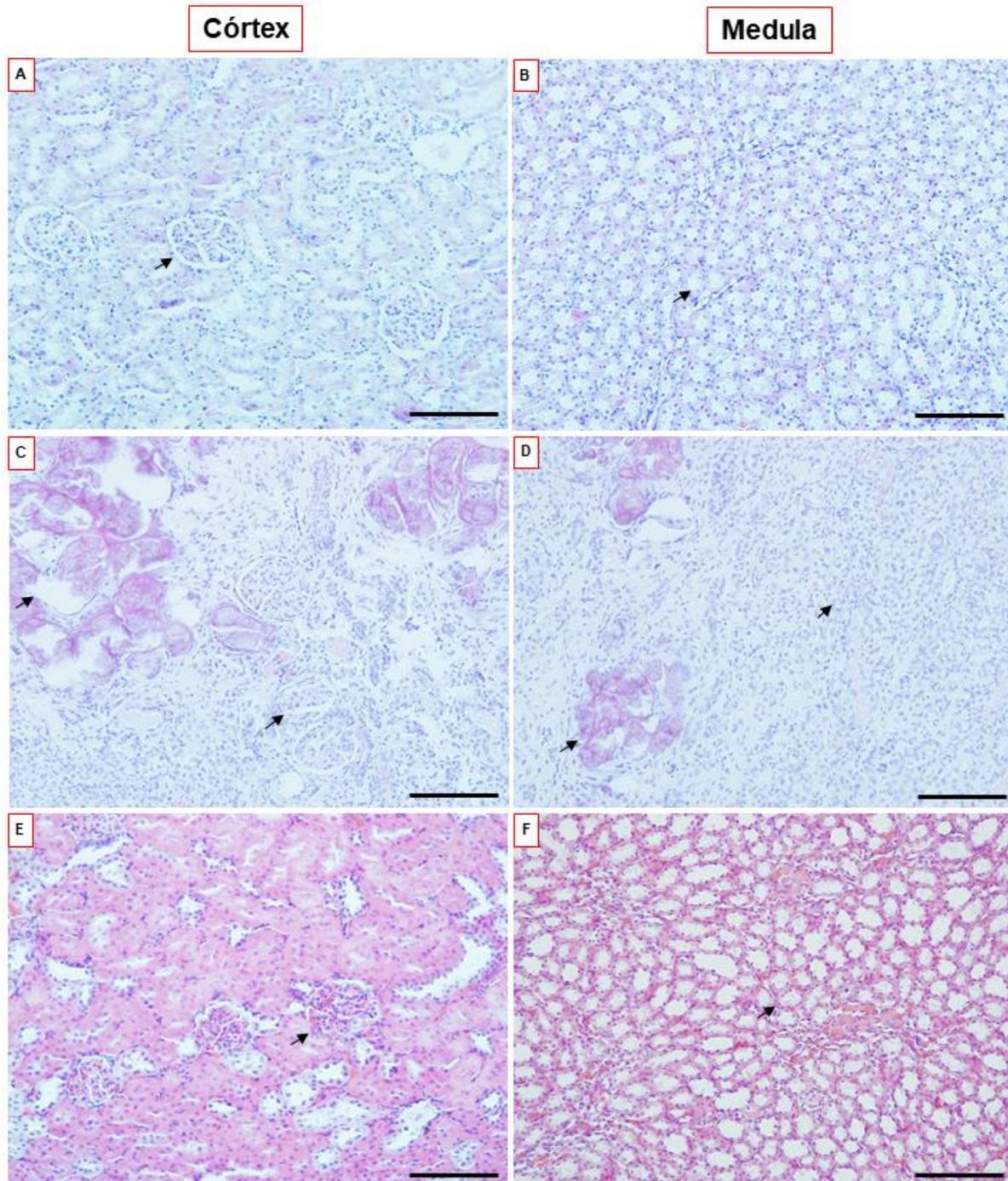
Fonte: A autora, 2019

3.7 Análise histológica dos rins nos grupos experimentais

A avaliação morfológica do rim corado com HE, mostrou que o rim esquerdo dos animais do grupo 2R1C apresenta esclerose e atrofia dos glomérulos, desestruturação do epitélio tubular com oclusão tubular, infiltrado inflamatório e fibrose intersticial, tanto na região cortical quanto na medular, comparado ao grupo sham (Figura 21A-D). Após 15 dias do transplante de CTM, observamos uma reestruturação dos glomérulos e do epitélio tubular na região cortical e medular, redução da fibrose intersticial e nos glomérulos, reestruturação da

luz tubular e redução do infiltrado inflamatório, comparado ao grupo 2R1C e semelhantes ao grupo sham (Figura 21E-F).

Figura 21 - Fotomicrografia de cortes do rim esquerdo corados com Hematoxilina-Eosina nos grupos sham, 2R1C e 2R1C+CTM



Nota: A- Córtex e B-medula, do rim esquerdo do grupo sham apresentam glomérulos e túbulos conservados (seta); C- Córtex do rim esquerdo do grupo 2R1C com esclerose e atrofia glomerular (seta); D- Medula do rim esquerdo do grupo 2R1C com fibrose intersticial e desestruturação tubular (seta); E- Córtex e F- Medula, do rim esquerdo dos animais 15 dias após o transplante de CTM com reestruturação dos túbulos e dos glomérulos (seta). Objetiva de 20x. Barra de calibração 15 μ m.

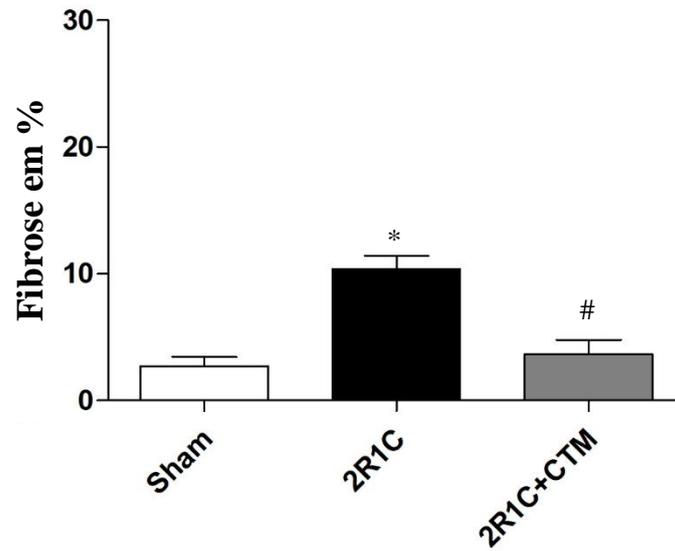
Fonte: A autora, 2019.

3.8 Avaliação quantitativa e qualitativa do colágeno por Picro Sirius Red

Para avaliação da fibrose evidenciada na coloração por HE, realizamos a coloração por Picro Sirius Red, que cora fibras de colágeno em vermelho, permitindo a quantificação destas áreas. Observamos que o grupo sham apresentou depósito de fibras de colágeno basal ($2,71\% \pm 0,19$) no entorno dos corpúsculos renais (córtex) e nos túbulos (medula) (Figura 23A-B e 22). O grupo 2R1C apresentou aumento ($10,38\% \pm 0,33$) de depósito de colágeno no interstício renal (medula), nos glomérulos e entre os corpúsculos renais (córtex) (Figura 23C-D e 22), comparado ao grupo sham. Assim, a fibrose está bem estabelecida no rim dos animais induzidos por hipertensão renovascular. Entretanto, após 15 dias de transplante de CTM observamos redução do depósito de fibras de colágeno ($3,64\% \pm 0,31$) entre os corpúsculos renais, nos glomérulos (córtex) e entre os túbulos (medula) (Figura 23E-F e 22) em comparação ao grupo 2R1C, assemelhando-se ao grupo sham, conferindo uma preservação maior do parênquima renal após o transplante de CTM.

A análise das imagens ao microscópio de luz polarizada evidenciou aumento do depósito de colágeno (vermelho) próximo aos vasos sanguíneos, tanto na região cortical quanto na região medular (Figura 24C-D), em comparação ao grupo sham (Figura 24A-B), corroborando os dados de microscopia de luz. Após 15 dias de transplante de CTM, não foi visualizado nenhum depósito de colágeno ao microscópio de luz polarizada (Figura 24E-F), semelhante ao grupo sham.

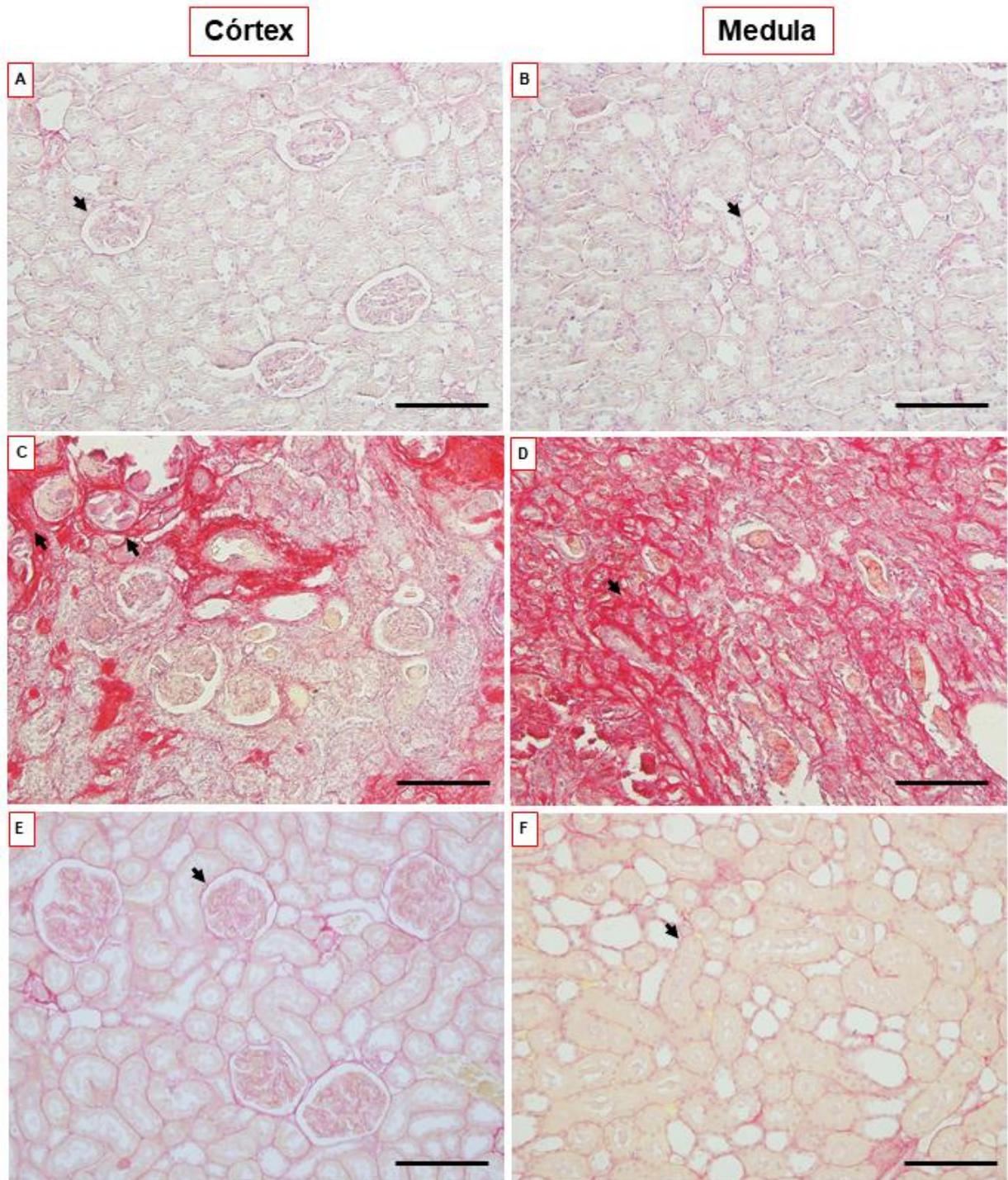
Figura 22 - Quantificação da fibrose por coloração com Picro Sirius Red



Nota: O rim esquerdo dos animais do grupo 2R1C apresentou aumento significativo de colágeno ($10,38\% \pm 0,33$) em relação ao grupo sham ($2,71\% \pm 0,19$). Entretanto, após 15 dias de transplante de CTM, os rins apresentaram redução significativa de fibras de colágeno ($3,64\% \pm 0,31$). Valores expressos com média \pm erro padrão, $n=6$ para todos os grupos. $p \leq 0,0001$ *diferença significativa com relação ao grupo Controle, #diferença significativa com relação ao grupo 2R1C. Analisado pelo teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2019

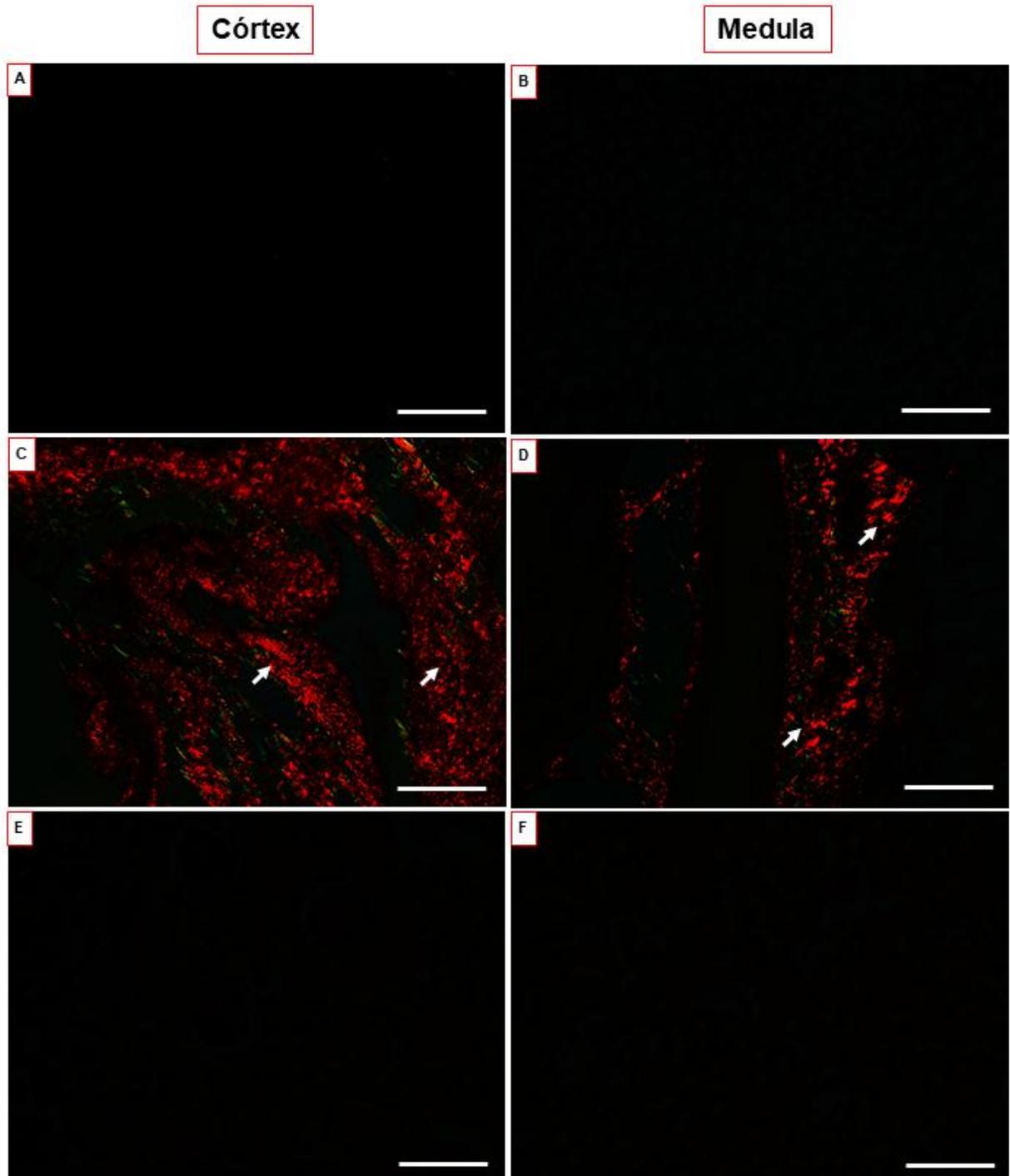
Figura 23 - Fotomicrografias de rim esquerdo corado com Picro Sirius Red



Nota: Fotomicrografias de rim esquerdo corado com Picro Sirius Red, evidenciando a distribuição do depósito de colágeno (vermelho). A- Córtex e B- Medula do rim esquerdo do grupo sham, apresentaram distribuição de colágeno basal ao redor dos corpúsculos renais e túbulos (seta); C- Córtex e D- Medula renal do grupo 2R1C, apresentaram acúmulo excessivo de fibras de colágeno (seta); E- Córtex e F- Medula do grupo após 15 dias de transplante de CTM, apresentaram redução de depósito de colágeno (seta), promovendo parênquima mais preservado. Objetiva de 20x. Barra de calibração 15 μ m.

Fonte: A autora, 2019

Figura 24 - Fotomicrografias de rim esquerdo corado com Picro Sirius Red e observado ao microscópio de luz polarizada



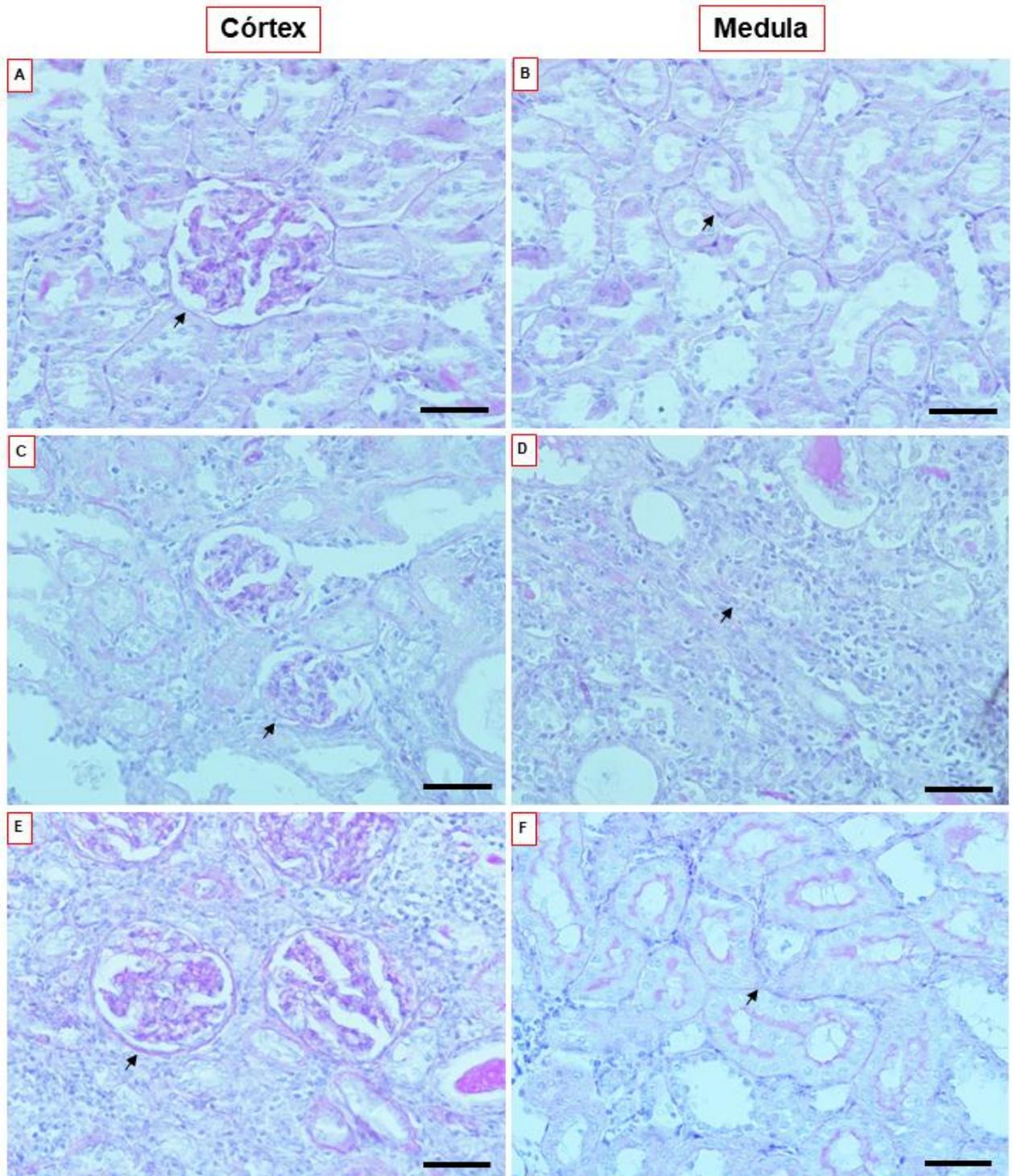
Nota: Fotomicrografias de rim esquerdo corado com Picro Sirius Red e observado ao microscópio de luz polarizada, evidenciando o depósito de colágeno. A- CórTEX e B- Medula do rim esquerdo do grupo sham; C- CórTEX e D- Medula de rim esquerdo apresentaram aumento de depósito de colágeno; E-CórTEX e F- Medula de rim esquerdo do grupo 2R1C após o transplante de CTM, não se observa depósito de colágeno. Objetiva de 20x. Barra de calibração 15 μ m.

Fonte: A autora, 2019.

3.9 Avaliação da integridade da membrana basal por coloração de ácido periódico-schiff (PAS)

Ao analisar a membrana basal corada na cor púrpura-magenta por PAS, observamos que a membrana basal apresentou-se íntegra no entorno dos corpúsculos renais (córtex) e ao longo dos túbulos na região medular no grupo sham (Figura 25A-B). No entanto, o grupo 2R1C apresentou intensa degradação da membrana basal, tanto no entorno dos corpúsculos renais (córtex) quanto entre os túbulos na região medular (Figura 25C-D), em relação ao grupo sham, mostrando que essa degradação colaborou para lesão renal e progressão da doença. Após o transplante de CTM, observamos reestruturação da membrana basal no entorno dos corpúsculos renais na região cortical e, principalmente, reestruturação da membrana basal entre os túbulos em toda região medular (Figura 25E-F), comparado ao grupo 2R1C.

Figura 25 - Fotomicrografias de cortes de rim esquerdo corados com PAS



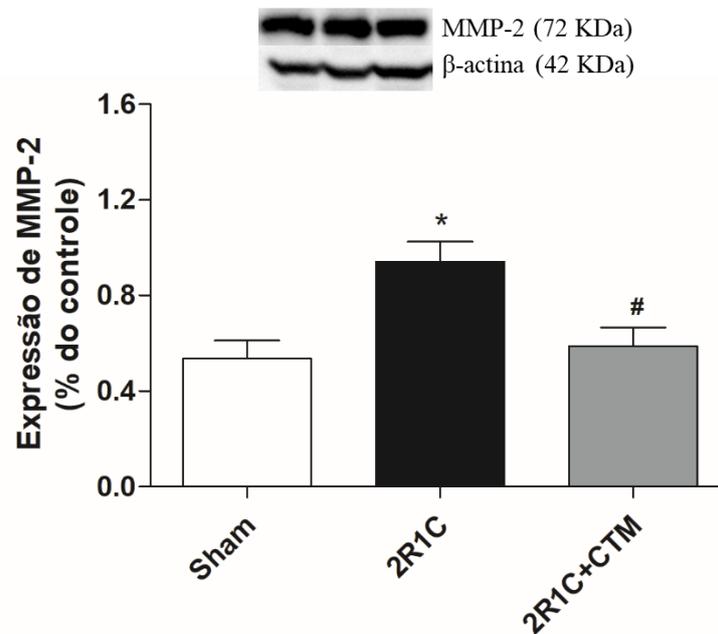
Nota: A-córtex e B- medula do rim esquerdo do grupo sham, apresentando membrana basal íntegra (seta); C- córtex e D-medula do rim esquerdo do grupo 2R1C, mostrando membrana basal degradada no corpúsculo renal e entre os túbulos (seta C, D, respectivamente); E- córtex e F-medula do rim esquerdo do grupo 2R1C+CTM, mostrando reestruturação da membrana basal na região do córtex e da medula (seta) após transplante de CTM. Objetiva de 40x. Barra de calibração 5 μ m.

Fonte: A autora, 2019.

3.10 Análise da expressão da metaloproteinase 2 (MMP-2) após o transplante de CTM

Ao analisar a expressão da MMP-2 por western blotting, observamos que o rim esquerdo dos animais do grupo 2R1C apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) de expressão da MMP-2 ($0,94 \pm 0,08$) em comparação ao grupo sham ($0,53 \pm 0,07$). Entretanto, o grupo que recebeu o transplante de CTM apresentou redução da expressão da MMP-2 ($0,58 \pm 0,07$) em comparação ao grupo 2R1C, assemelhando-se aos níveis encontrados no grupo sham (Figura 26).

Figura 26 - Expressão de MMP-2 após o transplante de CTM



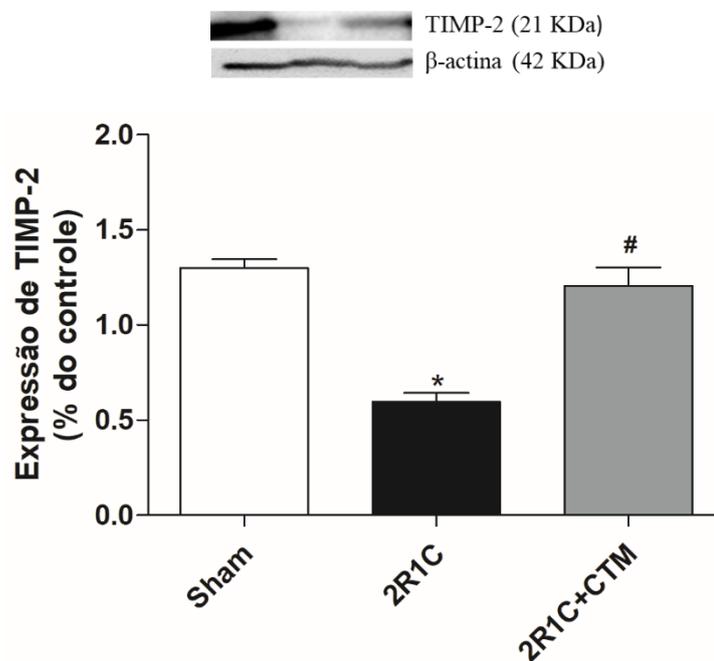
Nota: Expressão da MMP-2 em extratos teciduais de rim nos grupos experimentais. Grupo 2R1C apresentou aumento de expressão de MMP-2, em comparação ao grupo sham. Após o transplante de CTM, ocorreu redução da expressão de MMP-2, em relação ao grupo 2R1C e semelhante ao grupo sham. Valores expressos como média \pm erro padrão, $n=6$ animais por grupo. $P < 0,05^*$ com relação ao grupo sham, $p < 0,05 \#$ com relação ao grupo 2R1C. A análise estatística realizada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. β -actina utilizada como controle interno.

Fonte: A autora, 2019.

3.11 Análise da expressão do Inibidor de Metaloproteinase Tecidual 2 (TIMP-2) após o transplante de CTM

A análise da expressão do inibidor de metaloproteinase tecidual 2 por western blotting mostrou que o rim esquerdo dos animais do grupo 2R1C apresentou redução da expressão de TIMP-2 ($0,59 \pm 0,04$, $p < 0,05$) em relação ao grupo sham ($1,29 \pm 0,04$, $p < 0,05$). No entanto, após o transplante de CTM observamos aumento da expressão de TIMP-2 ($1,20 \pm 0,09$, $p < 0,05$) em comparação ao grupo 2R1C (Figura 27) e semelhante ao grupo sham.

Figura 27 - Expressão de TIMP-2 em extratos teciduais de rim nos grupos experimentais



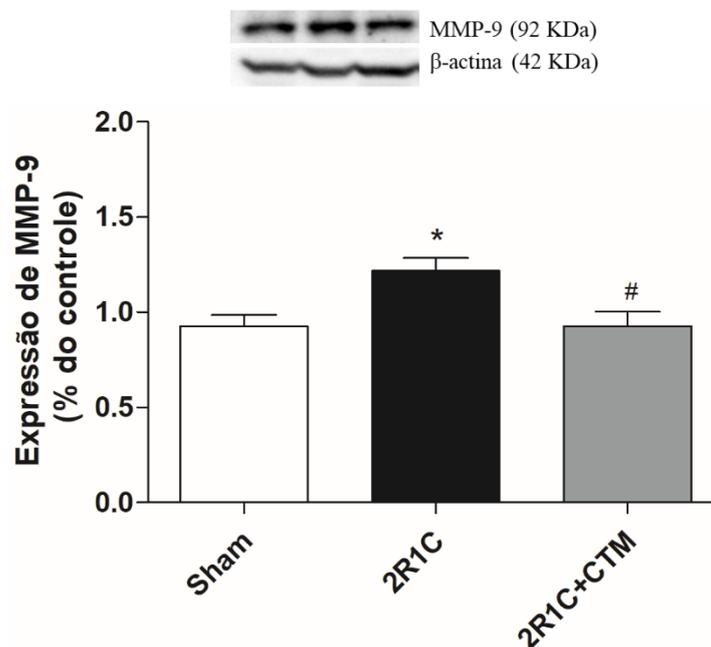
Nota: Grupo 2R1C apresentou redução de expressão da TIMP-2, em comparação ao grupo sham. Após o transplante de CTM, ocorreu aumento da expressão de TIMP-2, em relação ao grupo 2R1C e semelhante ao grupo sham. Valores expressos como média \pm erro padrão, $n=6$ animais por grupo. $P < 0,05$ * diferença em relação ao grupo sham, $p < 0,05$ # diferença em relação ao grupo 2R1C. A análise estatística realizada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. β -actina utilizada como controle interno.

Fonte: A autora, 2019.

3.12 Análise da expressão da metaloproteinase 9 (MMP-9) após o transplante de CTM

O rim esquerdo dos animais do grupo 2R1C apresentou aumento significativo da expressão de MMP-9 ($1,21 \pm 0,16$, $p < 0,05$) em comparação ao grupo Sham ($0,92 \pm 0,14$). Após o transplante de CTM, observamos redução significativa da expressão da MMP-9 ($0,92 \pm 0,18$, $p < 0,05$) em relação ao grupo 2R1C, e semelhante ao grupo Sham (Figura 28).

Figura 28 - Expressão da MMP-9 em extratos teciduais de rim nos grupos experimentais



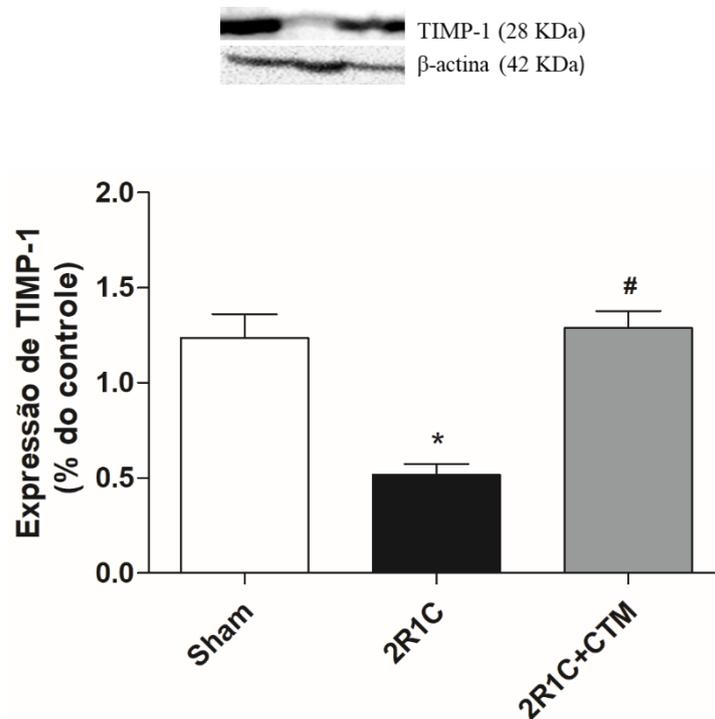
Nota: Grupo 2R1C apresentou aumento de expressão de MMP-9, em comparação ao grupo sham. Após o transplante de CTM, ocorreu redução da expressão de MMP-9, em relação ao grupo 2R1C e semelhante ao grupo sham. Valores expressos como média \pm erro padrão, $n=6$ animais por grupo. $P < 0,05$ * diferença significativa em relação ao grupo sham, $p < 0,05$ # diferença significativa em relação ao grupo 2R1C. A análise estatística realizada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. β -actina utilizada como controle interno.

Fonte: A autora, 2019.

3.13 Análise da expressão do Inibidor de Metaloproteinase Tecidual 1 (TIMP-1) após o transplante de CTM

A análise da expressão do inibidor de metaloproteinase tecidual 1 por western blotting mostrou que o rim esquerdo dos animais do grupo 2R1C apresentou redução na expressão da TIMP-1 ($0,51 \pm 0,13$, $p < 0,05$) em comparação ao grupo Sham ($1,23 \pm 0,28$). Após o transplante de CTM, observamos aumento da expressão de TIMP-1 ($1,28 \pm 0,20$, $p < 0,05$) em comparação ao grupo 2R1C, e semelhante ao grupo Sham (Figura 29).

Figura 29 - Expressão de TIMP-1 em extratos teciduais de rim nos grupos experimentais



Nota: Grupo 2R1C apresentou redução de expressão da TIMP-1, em comparação ao grupo sham. Após o transplante de CTM, ocorreu aumento da expressão de TIMP-1, em relação ao grupo 2R1C e semelhante ao grupo sham. Valores expressos como média \pm erro padrão, $n=6$ animais por grupo. $P < 0,05$ *diferença significativa em relação ao grupo sham, $p < 0,05$ # diferença significativa em relação ao grupo 2R1C. A análise estatística realizada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. β -actina utilizada como controle interno.

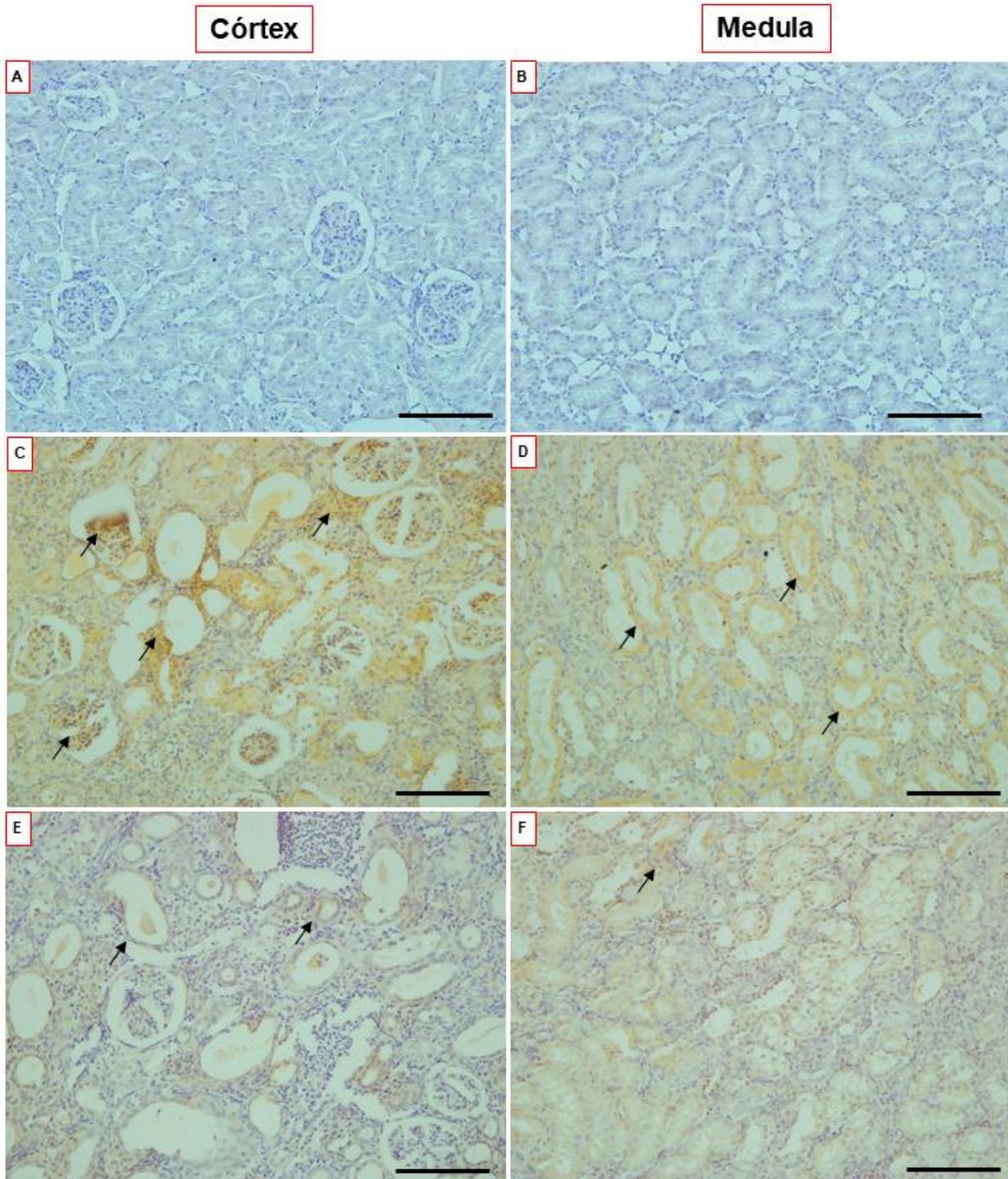
Fonte: A autora, 2019

3.14 Análise qualitativa e quantitativa do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

A análise da imuno-histoquímica para TNF- α em cortes de rim esquerdo dos animais do grupo 2R1C revelou marcação significativa nos glomérulos e túbulos na região cortical, além de marcação intensa ao longo dos túbulos na região medular (Figura 30C-D) em comparação ao grupo Sham (Figura 30A-B), que não apresentou marcação específica para TNF- α . Após o transplante de CTM observamos diminuição de marcação de TNF- α , tanto nos glomérulos (córtex) quanto nos túbulos (medula) (Figura 30E-F).

A quantificação de TNF- α por western blotting no rim esquerdo dos animais do grupo 2R1C apresentou aumento da expressão de TNF- α ($0,88 \pm 0,11$) em relação ao grupo Sham ($0,70 \pm 0,05$). Após o transplante de CTM observamos redução significativa da expressão de TNF- α ($0,68 \pm 0,06$) em relação aos animais do grupo 2R1C (Figura 31), com níveis próximos ao grupo Sham, confirmando os resultados da imuno-histoquímica.

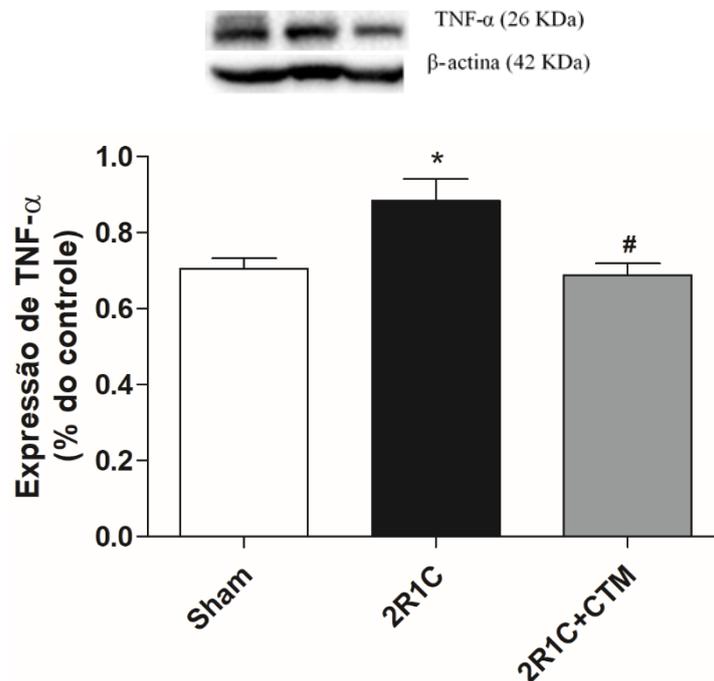
Figura 30 - Fotomicrografias de cortes dos rins esquerdos imunomarcados com anticorpo específico para fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)



Nota: A-córtex e B- medula do rim esquerdo do grupo sham, sem marcação específica para TNF- α ; C-córtex e D-medula do rim esquerdo do grupo 2R1C, mostrando marcação específica para TNF- α nos glomérulos (seta- C) e nos túbulos (seta D); E- córtex e F-medula do rim esquerdo do grupo 2R1C+CTM, mostrando redução da marcação para TNF- α nos glomérulos e túbulos (E,F, respectivamente). Objetiva de 20x. Barra de calibração de 15 μ m.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 31 - Expressão de TNF- α em extratos teciduais de rim nos grupos experimentais



Nota: Grupo 2R1C apresentou aumento da expressão de TNF- α em comparação ao grupo sham. Após o transplante de CTM, ocorreu redução da expressão do TNF- α em relação ao grupo 2R1C, e semelhante ao grupo sham. Valores expressos como média \pm erro padrão, n=6 animais por grupo. P < 0,05 *diferença significativa em relação ao grupo sham, p < 0,05 #diferença significativa em relação ao grupo 2R1C. A análise estatística realizada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. β -actina utilizada como controle interno.

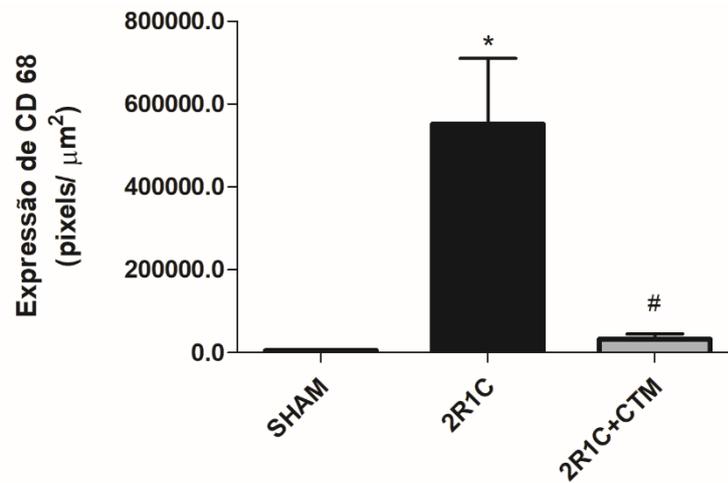
Fonte: A autora, 2019.

3.15 Avaliação da marcação de CD68 após o transplante de CTM

A análise da imuno-histoquímica para CD68 em cortes de rim esquerdo dos animais do grupo 2R1C demonstrou intensa marcação pontual de macrófago entre os corpúsculos renais (córtex) e entre os túbulos (medula) (Figura 32C-D), comparado ao grupo sham (Figura 32A-B). No entanto, após o transplante de CTM, observamos redução de marcação de CD68, tanto na região cortical quanto na região medular (Figura 32E-F).

Para confirmar esses resultados, quantificamos as imagens marcadas e observamos que o rim esquerdo do grupo 2R1C apresentou aumento significativo de macrófago em relação ao grupo Sham ($551.887 \pm 0,29$ vs. $5.834 \pm 5,9$). Porém, após 15 dias de transplante de CTM, os rins apresentaram redução significativa de macrófago ($33.240 \pm 5,65$) (figura 33).

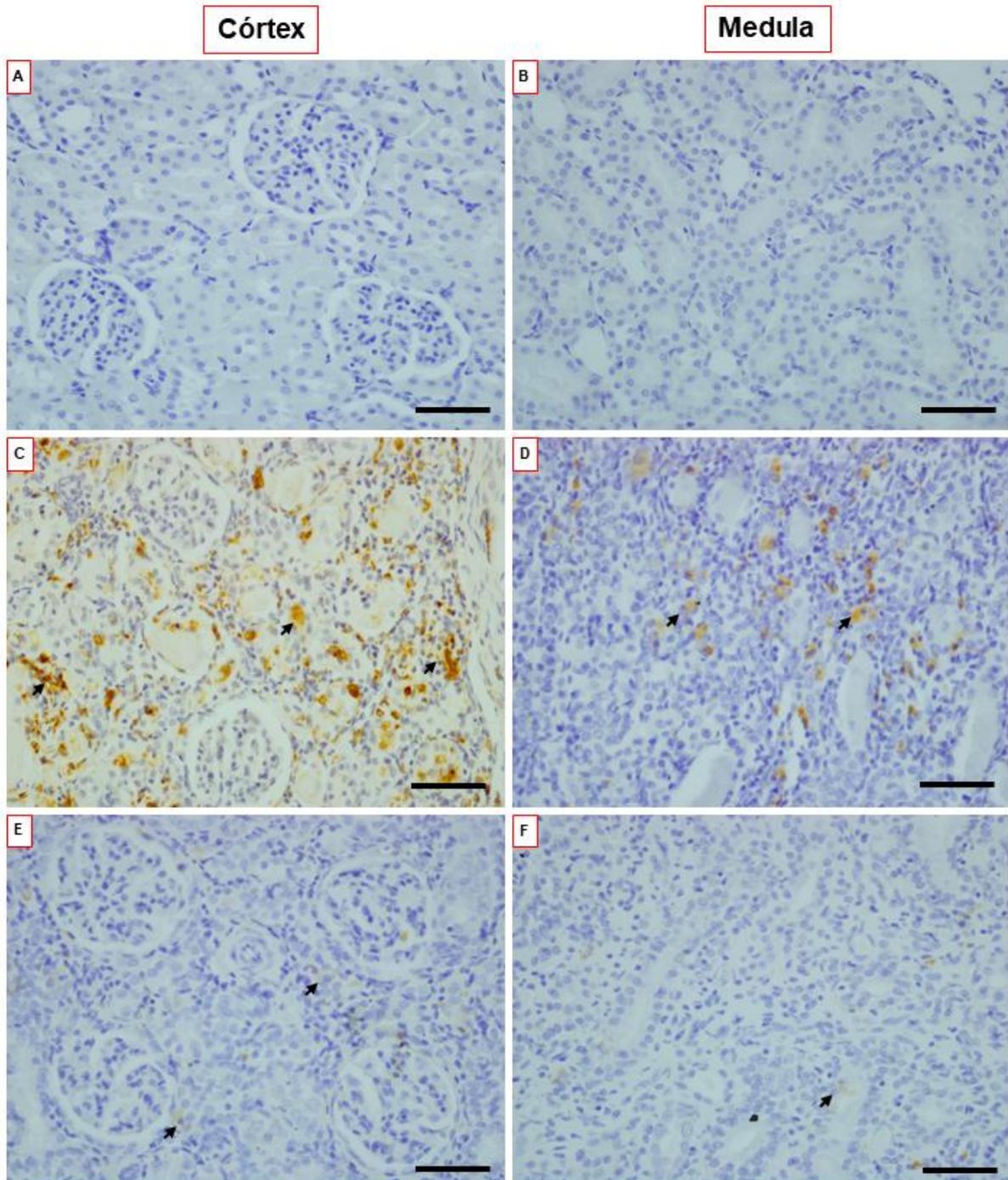
Figura 32 - Quantificação de CD68 (macrófago) por imuno-histoquímica nos grupos experimentais



Nota: O rim esquerdo dos animais do grupo 2R1C apresentou aumento significativo de CD 68 ($551.887 \pm 0,29$) em relação ao grupo sham ($5.834 \pm 5,9$). Entretanto, após 15 dias de transplante de CTM os rins apresentaram redução significativa de CD68 ($33.240 \pm 5,65$). Foi utilizado o programa Image Pro. Valores expressos com média \pm erro padrão, n=5 para todos os grupos. $p \leq 0,0001$ *diferença significativa com relação ao grupo Controle, #diferença significativa com relação ao grupo 2R1C. Analisado pelo teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 33 - Fotomicrografias de cortes dos rins esquerdos imunomarcados com anticorpos específicos para CD68



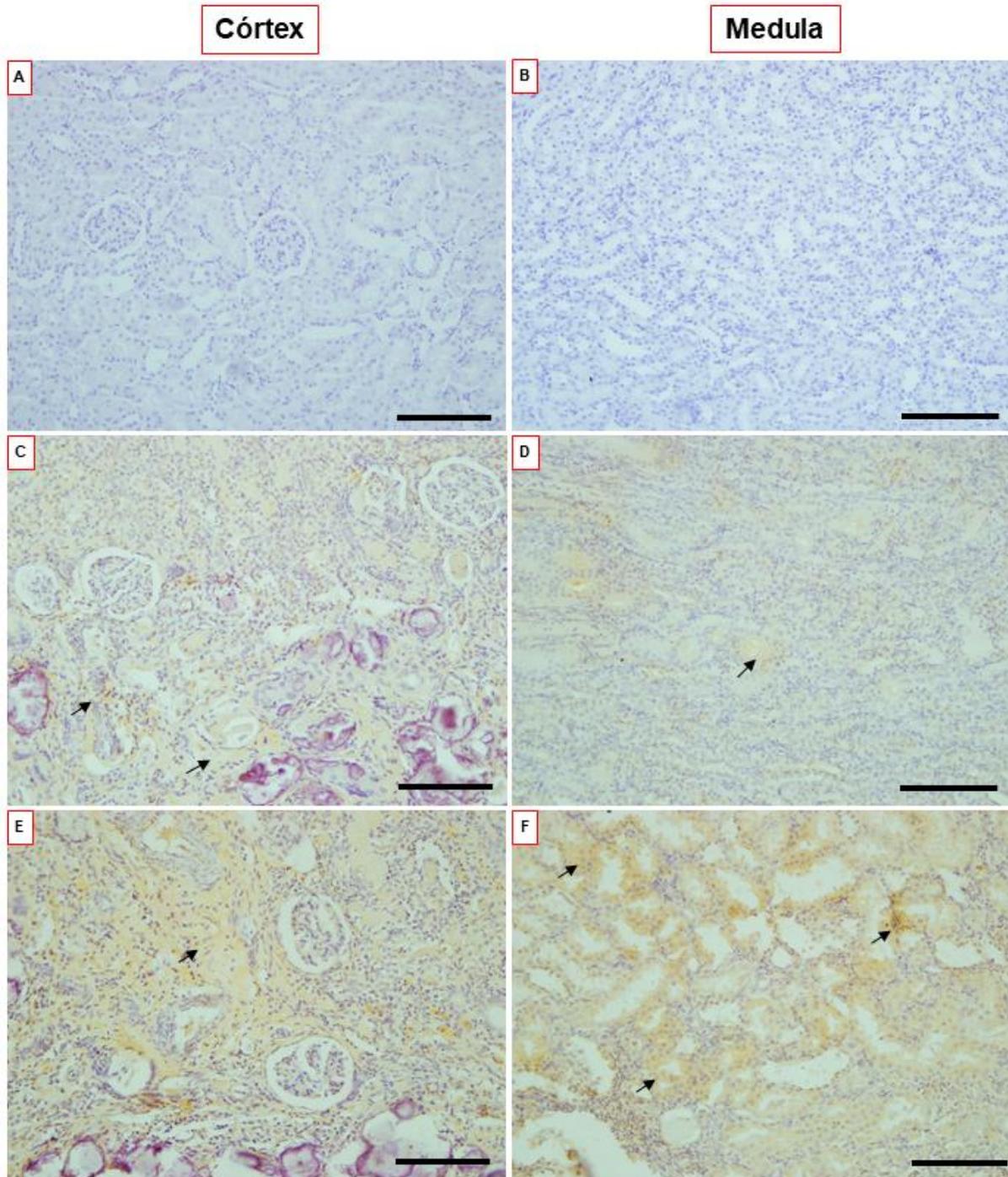
Nota: A-córtex e B- medula do rim esquerdo do grupo sham, sem marcação específica para CD68; C-córtex e D- medula do rim esquerdo do grupo 2R1C, mostrando marcação específica para CD68 entre os corpúsculos renais (seta- C) e entre os túbulos (seta D); E- córtex e F-medula do rim esquerdo do grupo 2R1C+CTM, mostrando redução da marcação para CD68 na região cortical e medular (E,F, respectivamente). Objetiva de 40x. Barra de calibração 5µm.

Fonte: A autora, 2019.

3.16 Avaliação de citocina anti-inflamatória IL-10 (Interleucina 10) após o transplante de CTM

A imuno-histoquímica para IL-10, uma citocina anti-inflamatória, revelou que o rim esquerdo dos animais do grupo 2R1C apresenta marcação fraca para IL-10 nos glomérulos, no entorno dos corpúsculos renais (córtex) e nos túbulos (medula) (Figura 34C-D) em relação ao grupo Sham (Figura 34A-B), que não apresentou marcação específica para IL-10. Entretanto, após o transplante de CTM observamos intensa marcação de IL-10 entre os corpúsculos renais (córtex) e nos túbulos (Figura 34E-F), comparado com o grupo 2R1C.

Figura 34 - Fotomicrografias de cortes dos rins esquerdos imunomarcados com anticorpos específicos para IL-10 (citocina anti-inflamatória)



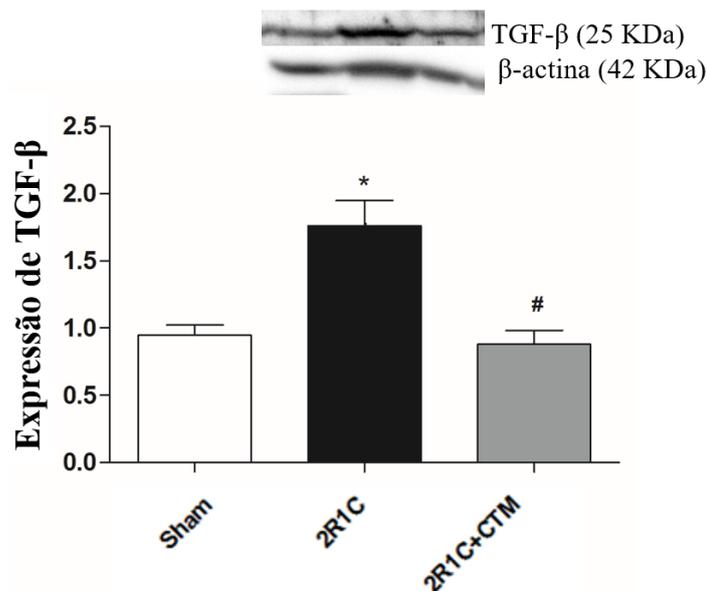
Nota: A-córtex e B- medula do rim esquerdo do grupo sham, sem marcação específica para IL-10; C-córtex e D- medula do rim esquerdo do grupo 2R1C, mostrando fraca marcação específica para IL-10 entre os corpúsculo renais (seta- C) e nos túbulos (seta D); E- córtex e F-medula do rim esquerdo do grupo 2R1C+CTM, mostrando marcação intensa para IL-10 na região cortical e medular (E,F, respectivamente).
Objetiva de 20x. Barra de calibração 15µm.

Fonte: A autora, 2019.

3.17 Análise da expressão do Fator de Crescimento de Transformação Beta (TGF- β) após o transplante de CTM

A análise do resultado da expressão de TGF- β por western blotting, fator de crescimento pró-fibrótico, mostrou que o rim esquerdo dos animais do grupo 2R1C apresentou aumento da expressão de TGF- β ($1,76 \pm 0,1$, $p < 0,05$) em relação ao grupo Sham ($0,94 \pm 0,07$, $p < 0,05$) (Figura 35). No entanto, após o transplante de CTM observamos redução da expressão de TGF- β ($0,88 \pm 0,1$, $p < 0,05$) em comparação ao grupo 2R1C, e semelhante ao grupo Sham (Figura 35).

Figura 35 - Expressão de TGF- β em extratos teciduais de rim esquerdo nos grupos experimentais



Nota: Grupo 2R1C apresentou aumento de expressão do TGF- β em comparação ao grupo sham. Após o transplante de CTM, ocorreu redução da expressão de TGF- β em relação ao grupo 2R1C e semelhante ao grupo sham. Valores expressos com média \pm erro padrão, $n=6$ animais por grupo. $P < 0,05$ *diferença significativa em relação ao grupo sham, $p < 0,05$ #diferença significativa em relação ao grupo 2R1C. A análise estatística pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. β -actina utilizada como controle interno.

Fonte: A autora, 2019.

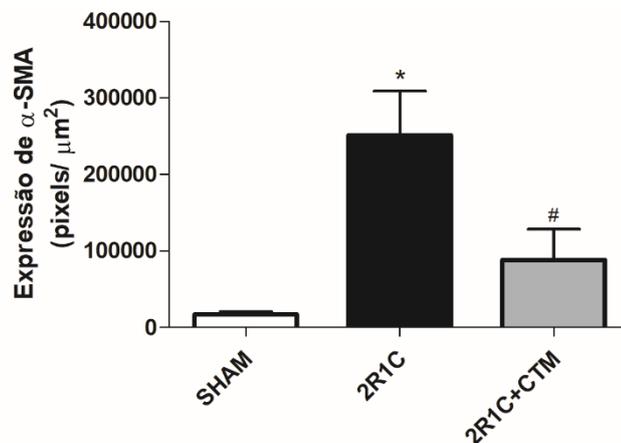
3.18 Avaliação da marcação de miofibroblasto após o transplante de CTM

A análise por imuno-histoquímica da alfa actina de músculo liso (α -SMA), proteína presente nos miofibroblastos, mostrou marcação mais intensa nos túbulos entre os corpúsculos renais (córtex) e nos túbulos na região medular (Figura 36C-D) do rim esquerdo

dos animais do grupo 2R1C comparado com o Sham (Figura 36A-B). Entretanto, após o transplante de CTM, observamos marcação fraca para miofibroblasto nos túbulos tanto na região cortical quanto medular (Figura 36E-F), comparado com o grupo 2R1C.

Para confirmar esses resultados, quantificamos as imagens marcadas e observamos que o rim esquerdo do grupo 2R1C apresentou aumento significativo de miofibroblasto em relação ao grupo Sham ($251.278 \pm 1,9$ vs. $17.109 \pm 6,0$). Porém, após o transplante de CTM, os rins apresentaram redução significativa de miofibroblasto ($88.336 \pm 4,2$) (figura 37).

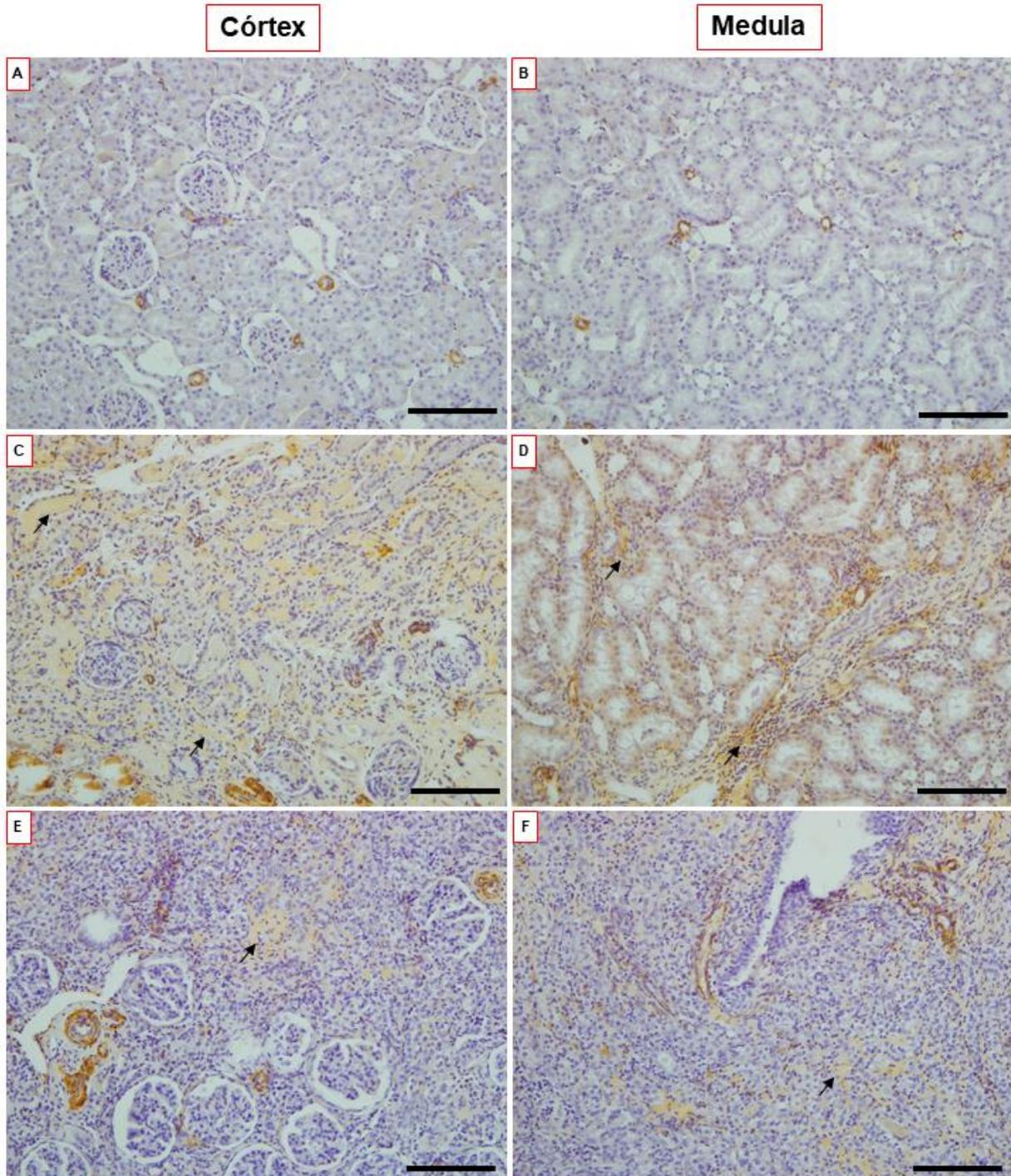
Figura 36 - Quantificação de α -SMA (miofibroblasto) por imuno-histoquímica nos grupos experimentais



Nota: Os rins esquerdos dos animais do grupo 2R1C apresentaram aumento significativo de α -SMA ($251.278 \pm 1,9$) em relação ao grupo sham ($17.109 \pm 6,0$). Após 15 dias de transplante de CTM os rins apresentaram redução significativa de α -SMA ($88.336 \pm 4,2$). Foi utilizado o programa Image Pro. Valores expressos com média \pm erro padrão, n=5 para todos os grupos. $p \leq 0,0001$ *diferença significativa com relação ao grupo Controle, #diferença significativa com relação ao grupo 2R1C. Analisado pelo teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 37 - Fotomicrografias de cortes dos rins esquerdos imunomarcados com anticorpo específico para alfa actina de musculo liso (miofibroblasto)



Nota: A-córtex e B- medula do rim esquerdo do grupo sham, sem marcação específica para miofibroblasto; C- córtex e D-medula do rim esquerdo do grupo 2R1C, mostrando marcação específica para miofibroblasto nos túbulos entre os corpúsculos renais (seta- C) e nos túbulos na região medular (seta D); E- córtex e F- medula do rim esquerdo do grupo 2R1C+CTM, mostrando redução de marcação para miofibroblasto nos túbulos na região cortical e medular (E,F, respectivamente). Objetiva de 20x. Barra de calibração 15 μ m.

Fonte: A autora, 2019.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado pela primeira vez que um único transplante com 10^6 CTM de origem da medula óssea na região subcapsular renal promoveu redução significativa das proteínas envolvidas na transição epitélio-mesenquimal, como MMP-2, MMP-9, α -SMA, TGF- β , reduzindo a degradação da membrana basal e impedindo a progressão da fibrose no rim clipado. Outros efeitos benéficos das CTM foram observados no rim clipado, como redução da inflamação, reestruturação do parênquima renal e, conseqüentemente, o restabelecimento da função renal. Estes achados mostram que essas células contribuíram de forma significativa para a regeneração renal.

As CTM derivadas da medula óssea têm sido utilizadas como uma ferramenta com grande potencial na terapia celular, pela sua habilidade de auto renovação e diferenciação em vários tipos celulares, além de apresentar um potencial de expansão *in vitro*, sem perder o fenótipo ou a capacidade de diferenciação (Bianco, 2014; Dah-Ching Ding & Lin, 2011; Dominici et al., 2006; Mizukami & Swiech, 2018). De acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC), nossos resultados mostraram que as células cultivadas *in vitro* na terceira passagem apresentaram aderência à garrafa de cultura, não perderam a capacidade de se diferenciar em células da linhagem adipogênica *in vitro*, e apresentaram alta expressão do marcador de superfície específico, CD105, e baixa expressão de marcador negativo, c-Kit, analisados pela citometria de fluxo.

Um ponto importante para o sucesso da terapia celular é a opção por uma via de administração, capaz de disponibilizar um grande número de células no local da lesão por um longo prazo, proporcionando, assim, uma interação com as células danificadas e um reparo tecidual efetivo (Cavaglieri et al., 2009; Sedrakyan et al., 2012; Villanueva et al., 2011; Zhu et al., 2013). Trabalho anterior do nosso grupo, demonstrou, após 15 dias de transplante de CTM GFP⁺ na região subcapsular renal, a presença dessas células na região do córtex renal e, com maior frequência, na medula renal dos rins clipados, próximo ao infiltrado de células inflamatórias e das regiões de fibrose (Lira et al., 2017). No presente trabalho, também utilizamos a via de administração na região subcapsular renal, sugerindo que esta interação das CTM com as células lesionadas por um longo prazo promoveu liberação de fatores parácrinos que influenciaram a reestruturação do parênquima renal e, também, o restabelecimento da função renal.

A DRC é estabelecida quando há perda progressiva dos néfrons, devido à lesão glomerular, onde há perda da função renal, aumentando a proteinúria (Heerspink & Zeeuw, 2013; Kefaloyianni et al., 2016; Loboda et al., 2016). Essa perda de proteínas é um parâmetro importante para a avaliação da função renal, e é considerada como um forte biomarcador de progressão da DRC que colabora com o dano tubulointersticial crônico, promovendo efeitos pró-inflamatórios e pró-fibróticos (Gorritz & Martinez-Castelao, 2012). Além disso, estudos sugerem que há uma associação do aumento da expressão da MMP-9 no soro e na urina com o grau de proteinúria em pacientes com nefropatia diabética (Tan & Liu, 2012).

Nossos resultados mostraram que, comparado ao grupo Sham, o grupo 2R1C teve aumento significativo de proteinúria e da expressão de MMP-9. Para confirmar, analisamos os resultados de proteínas totais séricas e observamos redução significativa no grupo 2R1C com relação ao grupo sham. Esses resultados sugerem que a hipertensão renovascular levou à lesão renal promovida pela MMP-9, ocasionando a liberação excessiva de proteínas plasmáticas para a urina. Outros autores também demonstraram alterações na proteinúria em modelos semelhantes e em outros modelos, como por exemplo em um estudo utilizando ratos submetidos à nefrectomia 5/6 para induzir DRC (Cavaglieri et al., 2009). Outro estudo, também mostrou que houve aumento da proteinúria em ratos induzidos à hipertensão renovascular (2R1C), sendo o mesmo modelo do nosso trabalho (Oliveira-Sales et al., 2013). Recentemente, o nosso grupo, também demonstrou aumento da proteinúria nos animais com hipertensão renovascular, que é bem característico deste modelo (Oliveira, 2017).

Além disso, a relação da MMP-9 com o grau de albuminúria foi comprovada por pacientes com resistência à albuminúria, apresentando aumento na atividade da MMP-9 sérica. Essa associação foi confirmada em ratos manipulados geneticamente, onde foram induzidos pelo modelo de albuminúria progressiva e apresentaram atividade da MMP-9 elevada, sugerindo que a MMP-9 colaborou na disfunção dos podócitos, promovendo a liberação de proteína na urina, o que também foi observado no nosso trabalho (Pulido-Olmo et al., 2016). Porém, após 15 dias de transplante de CTM, o nível de proteínas séricas foi restabelecido, a proteinúria foi reduzida e a expressão da MMP-9 diminuiu significativamente. Portanto, esses resultados sugerem que essas células foram capazes de restabelecer a função renal e de reduzir a proteinúria.

Um dos biomarcadores mais utilizados para avaliação da função renal é a creatinina, uma substância totalmente filtrada e excretada na urina e que não é reabsorvida pelo organismo. Porém, é importante associar a creatinina com outros parâmetros, como proteinúria e ureia. Assim, a avaliação desses parâmetros auxilia na elucidação da condição clínica do paciente

(Abensur, 2011; Kitching & Hutton, 2016). Nossos resultados mostraram aumento significativo da creatinina sérica no grupo 2R1C, complementando a análise da proteinúria. Esses animais apresentaram lesão renal, que conseqüentemente, levou à disfunção renal característica do modelo. Outros trabalhos, também utilizando modelo de lesão renal crônica, apresentaram aumento da creatinina sérica em ratos com nefrectomia e com obstrução ureteral unilateral (Fang et al., 2015; Güneş et al., 2018). Após 15 dias do transplante de CTM não foi observado redução significativa na creatinina sérica nesses animais. No entanto, outro autor relata que após 15 ou 30 dias de transplante de CTM em ratos com lesão renal crônica induzida por adriamicina não ocorreu redução significativa no nível da creatinina (Zoja et al., 2018), mostrando que, provavelmente, não houvesse tempo hábil para que o nível de creatinina fosse reduzido.

A ureia também é um dos biomarcadores mais utilizados para avaliação da função renal, porém, é o menos sensível dos três biomarcadores, pois é parcialmente reabsorvida pelo túbulo renal após a filtração. Dependendo da condição clínica que estimule a reabsorção tubular de sódio, promoverá um aumento da ureia. Além disto, a ureia não é produzida constantemente ao longo do dia, podendo variar com a ingestão de alimentos ricos em proteínas, e podendo, também, ser eliminados pelo trato gastrointestinal e pela transpiração (Abensur, 2011; Kobayashi et al., 2014; Sodrét et al., 2007; Steubl et al., 2016). A análise dos resultados mostrou que os animais do grupo 2R1C apresentaram aumento da ureia sérica, em comparação ao grupo Sham, confirmando, juntamente com os dados da creatinina e da proteinúria, que este modelo causou um dano renal, ocasionando a disfunção renal e, assim, estabelecendo o modelo de doença renal crônica. Recentemente, nosso grupo observou aumento de ureia nos animais com hipertensão renovascular (Oliveira, 2017). Um outro estudo, utilizando nefrectomia no rim de ratos, também apresentou um aumento da ureia característico do modelo (Fang et al., 2015). Após 15 dias do transplante de CTM nos animais com hipertensão renovascular, observamos redução do nível da ureia sérica. Já foi demonstrado que a terapia com CTM de medula óssea promoveu diminuição dos níveis de creatinina e da ureia em ratos com doença renal crônica induzida por isquemia-reperfusão e terapia com imunossupressor (Alfarano et al., 2012). Mostrando, novamente, os efeitos benéficos que essas células promoveram diante de uma lesão renal, restabelecendo a função renal.

O modelo experimental de hipertensão renovascular (2R1C), proposto por Goldblatt (1934), reduz a perfusão do rim clipado, ativando o SRAA e levando ao aumento da pressão arterial, promovendo estresse oxidativo, inflamação, perda microvascular, fibrose intersticial e

atrofia tubular, o que resulta em insuficiência renal (Li et al., 2017; Oliveira-Sales & Boim, 2016). Esta redução da perfusão renal promove atrofia do rim esquerdo e hipertrofia do rim contralateral, ocorrendo de forma compensatória. Deste modo, observa-se uma discrepância no tamanho entre os rins esquerdo e direito, uma das características deste modelo (Al-Suraih & Grande, 2014; Amat et al., 2014). Nossos resultados mostraram que o grupo 2R1C apresentou aumento da pressão arterial em relação ao grupo Sham. Além disso, a estenose no rim esquerdo provocou uma lesão intensa e crônica, resultando na atrofia do rim clipado e hipertrofia do rim contralateral. Neste grupo, também observamos que o rim esquerdo apresentou glomerulosclerose, oclusão e desestruturação tubular, fibrose nos túbulos e no interstício e presença de infiltrado celular. No entanto, após 15 dias de transplante de CTM, os rins apresentaram restabelecimento do parênquima renal com reestruturação dos glomérulos e dos túbulos e redução significativa da fibrose. Trabalhos anteriores do nosso grupo e da literatura também observaram resultados similares, sugerindo que as CTM foram capazes de contribuir para a regeneração renal por meio da reestruturação dos glomérulos e túbulos, diminuindo a fibrose, a proteinúria, a inflamação e a apoptose (Oliveira-Sales et al., 2013; Oliveira, 2017; Peired et al., 2016).

As MMP possuem um papel importantíssimo na progressão da fibrose renal, pois atuam colaborando para a transição epitélio-mesenquimal (TEM) das células tubulares. Em condições patológicas, há um desequilíbrio na relação entre MMPs e inibidores de MMPs teciduais (TIMPs). As MMP-2 e MMP-9 atuam degradando constituintes da membrana basal tubular dos rins, como o colágeno tipo IV e a laminina. Esta ruptura da membrana basal colabora para que as células epiteliais tubulares se diferenciem em fibroblasto (células de origem mesenquimal) e migrem para interstício (Cheng et al., 2017; Nisticò et al., 2012; Zhao, 2013). Além disso, foi demonstrado que a MMP-9 é capaz de ativar a forma latente do TGF- β em sua forma ativa, o que, por sua vez, estimula a diferenciação do fibroblasto em miofibroblasto. Assim, esta célula contrátil produz excessivamente proteínas de matriz extracelular, promovendo a progressão da fibrose (Higashi et al., 2018; Kobayashi et al., 2014; Zhao et al., 2017). Nossos resultados mostraram que os rins do grupo 2R1C apresentaram aumento da expressão de MMP-2 e da MMP-9, enquanto que a expressão de TIMP-1 e TIMP-2 apresentou-se reduzida em relação ao grupo controle. Além disso, observamos degradação da membrana basal nos rins do grupo 2R1C, corroborando os resultados das MMPs e TIMPs. Também observamos que o grupo 2R1C apresentou aumento da expressão de TGF- β e aumento de marcação para miofibroblasto, tanto na região da medula quanto na região do córtex renal. Estes resultados sugerem que a TEM foi induzida

através das MMPs degradando a membrana basal, em especial, a MMP-9, colaborando para ativação do fator pró-fibrótico TGF- β e, assim, ativando os miofibroblastos, que colaboram para progressão da fibrose através da secreção de proteínas de matriz extracelular. Além disso, também observamos aumento de depósito de colágeno no rim esquerdo do grupo 2R1C, evidenciando a progressão da fibrose. Já foi demonstrado que a utilização de ablação da MMP-9 em camundongos com obstrução ureteral foi capaz de atenuar lesões morfológicas nos rins, como a redução da ruptura da membrana basal, da expressão de fibronectina, e a redução de miofibroblasto, diminuindo a TEM, mostrando a influência da MMP-9 na patogênese da fibrose renal (Wang et al., 2010). A ação da MMP-9 também colaborou para indução da TEM em células epiteliais tubulares proximais (NRK52E) mediada pelo fator TGF- β (Zhao et al., 2017). No modelo experimental com até 14 dias após a OUU em ratos foi observado que as MMP-9 tiveram uma regulação positiva nos rins. No estágio inicial da doença, observaram que as MMP-9 eram originadas predominantemente de células epiteliais tubulares, enquanto no estágio avançado da OUU observaram que as MMP-9 eram originadas de macrófagos, miofibroblastos, além das células epiteliais tubulares. Neste mesmo trabalho, foi induzido uma inibição precoce e tardia da MMP-9 através de anticorpos neutralizantes em ratos com OUU e observaram uma redução significativa da TEM de células tubulares e da fibrose renal (Tan et al., 2013). Recentemente, já foi demonstrado que a expressão de RNAm da MMP-2 apresentou regulação positiva no rins de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina e em camundongos com doença renal crônica induzida por nefrectomia 5/6, colaborando para a fibrose tubulointersticial e a glomeruloesclerose (Rhee et al., 2018). Nossos resultados mostraram que após 15 dias de transplante de CTM ocorreu redução da expressão da MMP-2 e MMP-9 pelo o aumento da expressão da TIMP-1 e TIMP-2 inibindo, assim, a atividade das MMPs e promovendo um equilíbrio no remodelamento renal. Além disso, observamos que a membrana basal apresentou-se mais íntegra, tanto na região cortical quanto na região medular, além da redução da expressão do fator pró-fibrótico TGF- β , redução na marcação de miofibroblasto na região cortical e medular renal e diminuição do depósito de colágeno no parênquima renal. O nosso grupo mostrou previamente que, após o transplante de CMMO em ratos com HR, o rim apresentou redução do depósito de colágeno e restabelecimento da E-caderina, uma proteína envolvida no processo de TEM (Oliveira, 2017). Utilizando o mesmo modelo de HR, porém com o transplante de CTM, também já demonstramos redução da fibrose tubulointersticial e glomerular (Lira et al., 2017). Em modelo de ratos com nefropatia diabética induzida por estreptozotocina foi observado um aumento da expressão de TGF- β nos rins, mas após o transplante de CMMO observaram que

a expressão do TGF- β apresentou reduzida (Castiglionea et al., 2013). Dados da literatura também descrevem que, após o transplante de CTM, ocorre redução significativa de miofibroblasto no rim de camundongos com lesão renal induzida por administração de albumina (Wu et al., 2014). Portanto, no nosso estudo, as CTM foram capazes de promover o equilíbrio entre MMP/TIMP, o que diminuiu a degradação da membrana basal e, a indução da TEM. Conseqüentemente, essas células promoveram redução da proliferação e ativação dos miofibroblastos mediado pelo TGF- β , de forma a impedir a progressão da fibrose renal.

O desenvolvimento da DRC induzida pela HR inicia-se com um estágio de lesão renal, no qual várias células atuam no processo de reparo tecidual, como neutrófilos, células T, macrófagos, células tubulares e endoteliais. Porém, a injúria tecidual já é o suficiente para promover a síntese de TNF- α e TGF- β , desenvolvendo processos inflamatórios e fibrótico (Heerspink & Zeeuw, 2013; Kefaloyianni et al., 2016; Loboda et al., 2016). Além disso, os macrófagos desempenham um papel importante na fibrose renal e DRC, que são as grandes fontes de TGF- β , responsável por ativar e proliferar miofibroblasto, assim, colaborando para indução da TEM e MMP, que também é responsável por induzir a transição (Zhao, 2013). Nossos resultados mostraram que os rins esquerdos dos animais do grupo 2R1C apresentam aumento macrófagos tanto na região medular quanto na região cortical, em relação ao grupo controle. Também observamos aumento de expressão de TNF- α e aumento de marcação na região do córtex e medula. Mostrando que o resultado dos macrófagos corroborou com os resultados da expressão do TGF- β e das MMP, sugerindo que os macrófagos induziram a síntese do TGF- β e das MMP, assim, colaborando para a progressão da fibrose. Além de mostrar que a lesão renal induzida pela HR colaborou para um processo inflamatório. No mesmo modelo de HR em ratos foi observado aumento de expressão de RNAm de TNF- α e IL-1 β e baixa expressão de RNAm de IL-10, porém, após o transplante de CTM ocorreu redução de expressão do RNAm de TNF- α e de IL-1 β e um aumento da expressão do RNAm de IL-10 (Oliveira-Sales et al., 2013). Nossos resultados mostraram que, após o transplante de CTM, ocorreu redução significativa dos macrófagos na região do córtex e da medula renal, redução da expressão e marcação de TNF- α e marcação mais intensa de IL-10, tanto na região cortical quanto na região medular. Estes resultados sugerem que as CTM foram capazes de promover um efeito benéfico, atenuando o processo inflamatório pela redução de TNF- α e estimulando o reparo tecidual através da citocina anti-inflamatória IL-10, proporcionando uma resposta imunomoduladora. Além disso, vários fatores solúveis desempenham papel importante nos efeitos imunossupressores das CTM, como HGF, prostaglandina E2 (PGE2),

TGF- β 1, indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), óxido nítrico e IL-10 (Oliveira-Sales & Boim, 2016).

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que apenas um transplante de CTM na região subcapsular renal no modelo 2R1C foi capaz de promover efeitos benéficos, como: (1) equilíbrio entre MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2, (2) Restauração da membrana basal, (3) diminuição da expressão do TGF- β , (4) redução de miofibroblasto, (5) redução de macrófagos, (6) aumento de marcação de IL-10, (7) redução de expressão de TNF- α , (8) redução da pressão arterial, (9) reestruturação do parênquima renal por meio da redução da fibrose, (10) restabelecimento da função renal através da redução da ureia e da proteinúria. Esses dados sugerem que o transplante de CTM é capaz de promover efeito imunomodulador e remodelamento renal, impedindo a progressão da fibrose por meio da transição epitélio-mesenquimal e contribuindo para a restauração morfológica e funcional do rim durante a doença renal crônica.

REFERÊNCIAS

- Abensur, H. (2011). Biomarcadores na Nefrologia. Roche.
- Abreu, S. C.; Weiss, D. J.; Rocco, P. R. M. (2016). Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells: A therapeutic option in respiratory diseases? *Stem Cell Research and Therapy*, v. 7, n. 1, p. 1–10.
- Abto. (2018). Registro Brasileiro de transplantes.
- Al-Suraih, M.; Grande, J. P. (2014). Management of renal artery stenosis: What does the experimental evidence tell us? *World journal of cardiology*, v. 6, n. 8, p. 855–60.
- Alfarano, C. et al. (2012). Intraparenchymal Injection of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Reduces Kidney Fibrosis After Ischemia-Reperfusion in Cyclosporine-Immunosuppressed Rats. *Cell Transplantation*, v. 21, p. 2009–2019.
- Amat, N. et al. (2014). Aqueous extract of *dioscorea opposita thunb* . normalizes the hypertension in 2K1C hypertensive rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, p. 1–10.
- Ankrum, J.; Karp, J. M. (2010) Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med*, v. 6, n. 9, p. 961–966.
- Asanuma, H.; Meldrum, D. R.; Meldrum, K. K. (2010). Therapeutic Applications of Mesenchymal Stem Cells to Repair Kidney Injury. *Journal of Urology*, v. 184, n. 1, p. 26–33.
- Bansal, N. et al. (2015). Development and Validation of a Model to Predict 5-Year Risk of Death without ESRD among Older Adults with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*, p. 363–371.
- Barton, M.; Sorokin, A. (2016). Endothelin and the Glomerulus in Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol*, v. 35, n. 2, p. 156–167.
- Beiral, H. J. V. et al. (2014). The impact of stem cells on electron fluxes, proton translocation, and ATP synthesis in kidney mitochondria after ischemia/reperfusion. *Cell Transplantation*, v. 23, n. 2, p. 207–220.
- Beusekom, C. D. Van; Zimmering, T. M. (2018). Profibrotic effects of angiotensin II and transforming growth factor beta on feline kidney epithelial cells. *Journal of Feline Medicine and Surgery*.
- Bianco, P. (2014). Mesenchymal stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, n. August, p. 445–448.
- Borges, F. T.; Convento, M. B.; Schor, N. (2018). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell : what next ? *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, p. 77–83.
- Boucquemont, J. et al. (2014). Regression methods for investigating risk factors of chronic

kidney disease outcomes : the state of the art. *BMC Nephrology*, v. 15, n. 1, p. 1–12.

Brew, K., & Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1803, n. 1, p. 55–71.

Brinkkoetter, P. T.; Hagmann, H. (2018). Experimental Models to Study Podocyte Biology: Stock-Taking the Toolbox of Glomerular Research. *Frontiers in Pediatrics* | www.frontiersin.org, v. 1, n. July, p. 193.

Bryan, E. et al. (2018) Moderate-intensity exercise and renin angiotensin system blockade improve the renovascular hypertension (2K1C)-induced gastric dysmotility in rats. *Life Sciences*, p. #pagerange#.

Calloni, R. et al. (2013) Reviewing and Updating the Major Molecular Markers for Stem Cells. *Stem Cells and Development*, v. 22, n. 9, p. 1455–1476.

Campos, R. R. et al. (2015). Mechanisms of renal sympathetic activation in renovascular hypertension. *Experimental Physiology*, v. 100, n. 5, p. 496–501.

Cao, J. et al. (2014). Cells derived from iPSC can be immunogenic - Yes or No? *Protein and Cell*, v. 5, n. 1, p. 1–3.

Castiglionea, R. C. et al. (2013). Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Promote Improvement in Glomerular Function in Rats with Early Diabetic Nephropathy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, p. 699–718.

Cavaglieri, R. C. et al. (2009) Mesenchymal Stem Cells Delivered at the Subcapsule of the Kidney Ameliorate Renal Disease in the Rat Remnant Kidney Model. *Transplantation Proceedings*, v. 41, n. 3, p. 947–951.

Cheng, Z. et al. (2017) MMP-2 and 9 in chronic kidney disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 4, p. 1–11.

Chou, Y.-H.; Chu, T.-S.; Lin, S.-L. (2018) Role of renin-angiotensin system in acute kidney injury-chronic kidney disease transition. *Nephrology*, v. 23, p. 121–125.

Chung, H. C. et al. (2015) Cell-based therapy for kidney disease. *Korean Journal of Urology*, v. 56, n. 6, p. 412–421.

Cuende, N.; Rico, L.; Herrera, C. (2012) Concise Review: Bone Marrow Mononuclear Cells for the Treatment of Ischemic Syndromes: Medicinal Product or Cell Transplantation? *STEM CELLS Translational Medicine*, v. 1, n. 5, p. 403–408.

Da Silva, A. F. et al. (2015) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and their conditioned medium attenuate fibrosis in an irreversible model of unilateral ureteral obstruction. *Cell Transplantation*, v. 24, n. 12, p. 2657–2666.

Dah-Ching Ding, W.-C. S.; Lin, S.-Z. (2011) Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, v. 20, p. 445–448.

Ding, L.; Morrison, S. J. (2013) Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*, v. 495, n. 7440, p. 231–235.

Djudjaj, S.; Boor, P. (2018) Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Molecular Aspects of Medicine*, n. April, p. 0–1.

Dominici, M. et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315–317.

Dominiczak, A. F.; Ferreri, N. R.; Graham, L. A. (2017) The role of renal transporters and novel regulatory interactions in the TAL that control blood pressure. *PresS. Physiol Genomics*, n. 97.

Fang, J. et al. (2015) A urine metabonomics study of chronic renal failure and intervention effects of total aglycone extracts of *Scutellaria baicalensis* in 5/6 nephrectomy rats. *Royal Society of Chemistry*, v. 5, p. 75612–75621.

Freire, T. (2017) *Análise Estrutural e Ultraestrutural do Rim de Ratos com Hipertensão Renovascular após Transplante de Células Mononucleares de Medula Óssea*. [s.l.: s.n.].

Garg, P. A (2018) Review of Podocyte Biology. *American Journal of Nephrology*, v. 47, n. suppl 1, p. 3–13.

GBD 2016 Causes of Death Collaborators. (2017) Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, v. 390, p. 1151–210.

Goldblatt, B. Y. H. et al. (1934) Studies On EXPERIMENTAL HYPERTENSION I. The Production Of Persistent Elevation Of Systolic Blood Pressure By Means Of Renal Ischemia * t (From the Institute of Pathology , Western Reserve University , Cleveland) PLATES 23 AND 24. *Journal Experimental Medicine*.

Gorritz, J. L.; Martinez-Castelao, A. (2012) Proteinuria: Detection and role in native renal disease progression. *Transplantation Reviews*, v. 26, n. 1, p. 3–13.

Grahammer, F. (2017) New structural insights into podocyte biology. *Cell and Tissue Research*, v. 369, n. 1, p. 5–10.

Güneş, I. et al. (2018) Effects of hydroxyethyl starch 130 / 0 . 4 on the kidney tissue of rats with ureteral obstruction. *Drug Design, Development and Therapy*, p. 3061–3070.

Heerspink, H.; Zeeuw, D. De. (2013) Novel drugs and intervention strategies for the treatment of chronic kidney disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*.

Herrmann, S. M.; Textor, S. C. (2018) Current Concepts in the Treatment of Renovascular Hypertension. *American Journal of Hypertension*, v. 31, n. 2, p. 139–149.

- Higashi, A. Y.; Aronow, B. J.; Dressler, G. R. (2018) Expression Profiling of Fibroblasts in Chronic and Acute Disease Models Reveals Novel Pathways in Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 30, p. 1–15.
- Hsiao, L. (2018) Raising awareness , screening and prevention of chronic kidney disease : It takes more than a village. *Nephrology*, v. 4, p. 107–111.
- Jaoude, J.; Koh, Y. (2016) Matrix metalloproteinases in exercise and obesity. *Vascular Health and Risk Management*, v. 12, p. 287–295.
- Junqueira, L.; Carneiro, J.(2017) *Histologia Básica. Texto e Atlas*. 13^a ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- Kasten, P. et al. (2012) Comparison of platelet-rich plasma and VEGF-transfected mesenchymal stem cells on vascularization and bone formation in a critical-size bone defect. *Cells Tissues Organs*, v. 196, n. 6, p. 523–533.
- Keating, A. (2012) Mesenchymal stromal cells: New directions. *Cell Stem Cell*, v. 10, n. 6, p. 709–716.
- Kefaloyianni, E. et al. (2016) ADAM17 substrate release in proximal tubule drives kidney fibrosis. *JCI insight*, v. 1, n. 13, p. 1–19.
- Kitching, A. R.; Hutton, H. L. (2016) *The Players : Cells Involved in Glomerular Disease*. v. 11.
- Kobayashi, T. et al. (2014) Exploration of novel predictive markers in rat plasma of the early stages of chronic renal failure. *Anal Bioanal Chem*, p. 1365–1376.
- Kortenoeven, M. L. A. et al. (2018) Vasopressin regulation of sodium transport in the distal nephron and collecting duct. p. 280–299.
- Kousios, A.; Kouis, P.; Panayiotou, A. G. (2016) Matrix metalloproteinases and subclinical atherosclerosis in chronic kidney disease: A systematic review. *International Journal of Nephrology*, v. 2016.
- Li, L. I. Q. et al. (2017) Establishment and evaluation of a reversible two - kidney , one - clip renovascular hypertensive rat model. *Experimental and therapeutic medicine*, p. 3291–3296.
- Lincevicius, G. S. et al. (2015) Aldosterone Contributes to Sympathoexcitation in Renovascular Hypertension. *American Journal of Hypertension*, v. 28, n. 9, p. 1083–1090.
- Lindoso, R. S. et al. (2014) Extracellular Vesicles Released from Mesenchymal Stromal Cells Modulate miRNA in Renal Tubular Cells and Inhibit ATP Depletion Injury. *Stem Cells and Development*, v. 23, n. 15, p. 1809–1819.
- Lira, R. et al. (2017) Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves renal function and Na⁺⁺K⁺-ATPase activity in rats with renovascular hypertension. *Cell and Tissue Research*, v. 369, n. 2, p. 287–301.

Liu, P. et al. (2014) Therapeutic action of bone marrow-derived stem cells against acute kidney injury. *Life Sciences*, v. 115, n. 1, p. 1–7.

Loboda, A. et al. (2016) TGF- β 1 / Smads and miR-21 in Renal Fibrosis and Inflammation. *Mediators of Inflammation*, v. 2016.

Lombardi, D.; Becherucci, F.; Romagnani, P. (2016) How much can the tubule regenerate and who does it? An open question. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 31, n. 8, p. 1243–1250.

Lugon, J. R. et al. (2018) A Web-Based Platform to Collect Data from ESRD Patients Undergoing Dialysis : Methods and Preliminary Results from the Brazilian Dialysis Registry. *International Journal of Nephrology*, v. 2018.

Marques, R. G.; Morales, M. M.; Petroianu, A. (2009) Brazilian law for scientific use of animals. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*, v. 24, n. 1, p. 69–74.

Martello, G.; Smith, A. (2014) The Nature of Embryonic Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 30, n. 1, p. 647–675.

Méndez-Ferrer, S. et al. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, v. 466, n. 7308, p. 829–834.

Mizukami, A.; Swiech, K. (2018) Mesenchymal Stromal Cells: From Discovery to Manufacturing and Commercialization. *Stem Cells International*, v. 2018, p. 1–13.

Moody, E. C.; Coca, S. G.; Sanders, A. P. (2018) Toxic Metals and Chronic Kidney Disease : a Systematic Review of Recent Literature. *Current Environmental Health Reports*.

Morigi, M.; De Coppi, P. (2014) Cell therapy for kidney injury: Different options and mechanisms - Mesenchymal and amniotic fluid stem cells. *Nephron - Experimental Nephrology*, v. 126, n. 2, p. 59–63.

Morrison, S. J.; Scadden, D. T. (2014) The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, v. 505, n. 7483, p. 327–334.

Nargesi, A. A.; Lerman, L. O.; Eirin, A. (2017) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for kidney repair: Current status and looming challenges. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 8, n. 1, p. 1–12.

Nazila Kamaly, John C. He, Dennis A. Ausiello, O. C. F. (2017) Nanomedicines for renal disease: current status and future applications. *Nat Rev Nephrol*, v. 12, n. 12, p. 29–39.

Ng, J. K.; Li, P. K. (2018) Chronic kidney disease epidemic : How do we deal with it ? *Nephrology*, v. 4, p. 116–120.

Nisticò, P.; Bissell, M. J.; Radisky, D. C. (2012) Epithelial-mesenchymal transition: General principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, n. 2, p. 1–10.

- Oliveira-Sales, E. B. et al. (2013) Mesenchymal stem cells (MSC) prevented the progression of renovascular hypertension, improved renal function and architecture. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11.
- Oliveira-Sales, E. B.; Boim, M. A. (2016) Mesenchymal stem cells and chronic renal artery stenosis. *J Physiol Renal Physiol*, n. 24, p. 2016–2019.
- Oliveira, M. (2017) Análise das interações celulares e citocinas envolvidas na regeneração do rim após o transplante de células mononucleares de medula óssea em ratos com hipertensão renovascular. [s.l: s.n.].
- Parrish, A. R. (2017) Matrix Metalloproteinases in Kidney Disease: Role in Pathogenesis and Potential as a Therapeutic Target. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, v. 148, p. 31–65.
- Peired, A. J.; Sisti, A.; Romagnani, P. (2016) Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Kidney Disease : A Review of Clinical Evidence. *Stem Cells International*, v. 2016.
- Peloso, A. et al. (2015) Prospect for kidney bioengineering : shortcomings of the status quo. *Expert Opin. Biol. Ther*, p. 1–12.
- Pereira, A. et al. (2018) The need for training in palliative care for physicians in other specialties : Brazilian nephrologists empowerment (or appropriation) on renal supportive care. *Annals of Palliative Medicine*, v. 7, n. Suppl 3.
- Pittayapruek, P. et al. (2016) Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 6.
- Pulido-Olmo, H. et al. (2016) Role of matrix metalloproteinase-9 in chronic kidney disease: a new biomarker of resistant albuminuria. *Clinical science (London, England : 1979)*, v. 130, n. 7, p. 525–38.
- Reinders, M. E. J. et al. (2014) Autologous bone marrow derived mesenchymal stromal cell therapy in combination with everolimus to preserve renal structure and function in renal transplant recipients. *Journal of Translational Medicine*, v. 12, n. 1, p. 1–11.
- Rezza, A.; Sennett, R.; Rendl, M. Adult Stem Cell Niches. *Cellular and Molecular Components*. [s.l: s.n.]. v. 107
- Rhee, H. et al. (2018) The expression of two isoforms of matrix metalloproteinase-2 in aged mouse models of diabetes mellitus and chronic kidney disease. *Kidney Research And Clinical Practice*, v. 2018, n. 3, p. 222–229.
- Rodriguez et al. (2006) Pioglitazone mitigates renal glomerular vascular changes in high-fat, high-calorie-induced type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F694–F701.
- Ross, M.; Pawlina, W. (2016) *Ross Histologia texto e atlas*. 7^a ed. São Paulo: [s.n.].
- Salvatori, M. et al. (2014) Regeneration and bioengineering of the kidney: Current status and

future challenges. *Current Urology Reports*, v. 15, n. 1.

Samadian, F.; Dalili, N.; Jamalian, A. (2017) New Insights Into Pathophysiology , Diagnosis , and Treatment of Renovascular Hypertension. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, v. 11, n. 2, p. 79–89.

Scadden, D. (2014) Nice neighborhood. *Cell.*, v. 100, n. 2, p. 130–134.

Scott, R. P.; Quaggin, S. E. (2015) The cell biology of renal filtration. *Journal of Cell Biology*, v. 209, n. 2, p. 199–210.

Sedrakyan, S. et al. (2012) Stem cells as a therapeutic approach to chronic kidney diseases. *Current Urology Reports*, v. 13, n. 1, p. 47–54.

Smith, A. et al. (2016) Management of Renovascular Hypertension. *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, p. 1–7.

Sodré, L. F.; Costa, B.; Lima, C. C. (2007) Avaliação da função e da lesão renal : um desafio laboratorial. *J Bras Patol Med Lab*, p. 329–337.

Spees, J. L.; Lee, R. H.; Gregory, C. A. (2016) Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 7, n. 1, p. 1–13.

Steppan, D. et al. (2018) Lack of connexin 40 decreases the calcium sensitivity of renin-secreting juxtaglomerular cells. *European Journal of Physiology*.

Steubl, D. et al. (2016) Plasma total C-terminal agrin fragment (tCAF) as a marker for kidney function in patients with chronic kidney disease. *Clin Chem Lab Med*.

Takahashi, K.; Yamanaka, S. (2013) Induced pluripotent stem cells in reproductive medicine. *Company of Biologists Ltd*, v. 12, n. 2, p. 39–46.

Tamplin, O. J. et al. (2016) Hematopoietic stem cell arrival triggers dynamic remodeling of the perivascular niche. *Cell*, v. 160, n. 0, p. 241–252.

Tan, R. J.; Liu, Y. (2012) Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *AJP: Renal Physiology*, v. 302, n. 11, p. F1351–F1361.

Tan, T. K. et al. (2013) Matrix metalloproteinase-9 of tubular and macrophage origin contributes to the pathogenesis of renal fibrosis via macrophage recruitment through osteopontin cleavage. *Laboratory Investigation*, v. 93, n. 4, p. 434–449.

Tashiro et al. (2004) Levels of urinary matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal* 18: 206–210.

Taub, M. (2018) Gene Level Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase in the Renal Proximal Tubule Is Controlled by Two Independent but Interacting Regulatory Mechanisms Involving Salt Inducible Kinase 1 and CREB-Regulated Transcriptional Coactivators. *International Journal of Molecular Sciences Review*.

Thakkar, U. G.; Vanikar, A. V.; Trivedi, H. L. (2017) Stem cell therapy: An emerging modality in glomerular diseases. *Cytotherapy*, v. 19, n. 3, p. 333–348.

Tonelli, M.; Riella, M. (2014) Chronic kidney disease and the ageing population. *Nephron - Clinical Practice*, v. 128, n. 5, p. 319–322.

Van Genderen, A. M. et al. (2018) Renal Tubular- and Vascular Basement Membranes and their Mimicry in Engineering Vascularized Kidney Tubules. *Advanced Healthcare Materials*, v. 1800529, p. 1800529.

Van Koppen, A. et al. (2012) Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease. *PLoS ONE*, v. 7, n. 6, p. 1–12.

Verdoorn, K. S. et al. (2010) Bone marrow mononuclear cells shift bioactive lipid pattern in injured kidney towards tissue repair in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 25, n. 12, p. 3867–3874.

Villanueva, S. et al. (2011) Mesenchymal stem cell injection ameliorates chronic renal failure in a rat model. *Clinical Science*, v. 121, n. 11, p. 489–499.

Wang H, Leng Y and Gong Y (2018) Bone Marrow Fat and Hematopoiesis. *Front. Endocrinol.* 9:694

Wang, X. et al. (2010) Mice lacking the matrix metalloproteinase-9 gene reduce renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, v. 299, n. 5, p. F973–F982.

Wang, Y. et al. (2014) Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology*, v. 15, n. 11, p. 1009–1016.

Wei, X. et al. (2013) Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 34, n. 6, p. 747–754.

Wise, A. F.; Ricardo, S. D. (2012) Mesenchymal stem cells in kidney inflammation and repair. *Nephrology*, v. 1416, p. 89–107.

Wu, H. J. et al. (2014) Mesenchymal Stem Cells Modulate Albumin-Induced Renal Tubular Inflammation and Fibrosis. *Plos one*, v. 9, n. 3, p. 1–15.

Wu, J.; Izpisua Belmonte, J. C. (2015) Dynamic Pluripotent Stem Cell States and Their Applications. *Cell Stem Cell*, v. 17, n. 5, p. 509–525.

Yamashita, Y. M.; Tumber, T. (2014) Stem cells and their niche in homeostasis/regeneration and disease. *Molecular biology of the cell*, v. 25, n. 6, p. 736.

Yu, A. S. L. (2017) Paracellular transport and energy utilization in the renal tubule. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, p. 1–7.

Zanirati, G. et al. (2015) Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Modulates Hippocampal Expression of Growth Factors in Chronically Epileptic Animals. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, v. 21, n. 5, p. 463–471.

Zhao, H. (2013) Matrix metalloproteinases contribute to kidney fibrosis in chronic kidney diseases. *World Journal of Nephrology*, v. 2, n. 3, p. 84.

Zhao, Y. et al. (2017) Matrix metalloproteinase 9-dependent Notch signaling contributes to kidney fibrosis through peritubular endothelial-mesenchymal transition. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 32, n. 5, p. 781–791.

Zheng, G. et al. (2009) Disruption of E-Cadherin by Matrix Metalloproteinase Directly Mediates Epithelial-Mesenchymal Transition Downstream of Transforming Growth Factor- α 1 in Renal Tubular Epithelial Cells. *The American Journal of Pathology*, v. 175, n. 2, p. 580–591.

Zhu, X. Y.; Lerman, A.; Lerman, L. O. (2013) Concise review: Mesenchymal stem cell treatment for ischemic kidney disease. *Stem Cells*, v. 31, n. 9, p. 1731–1736.

Zoja, C. et al. (2018) Mesenchymal stem cell therapy promotes renal repair by limiting glomerular podocyte and progenitor cell dysfunction in adriamycin-induced nephropathy. *J Physiol Renal Physiol*, n. 48, p. 1370–1381.