

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Camila Luna da Silva

Estudo da morfologia e status oxidativo em rim de ratos com nefropatia isquêmica após tratamento com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo

> Rio de Janeiro 2020

Camila Luna da Silva

Estudo da morfologia e status oxidativo em rim de ratos com nefropatia isquêmica após tratamento com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo

Tese apresentada, como requisito para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a. Dra Ana Carolina Stumbo Machado

20 E

Rio de Janeiro 2020

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

S586	Silva, Camila Luna da. Estudo da morfologia e status oxidativo em rim de ratos com nefropatia isquêmica após tratamento com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo/ Camila Luna da Silva. – 2020. 125f.
	Orientadora: Prof.ª Dra. Ana Carolina Stumbo Machado.
	Doutorado (Tese) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.
	1. Rins – Doenças - Teses. 2. Nefropatias. 3. Células-tronco - Teses. 4. Células-Tronco Mesenquimais. 5. Estresse oxidativo – Teses. I. Machado, Ana Carolina Stumbo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Humana e Experimental. III. Título.
	CDU 616.61
	Bibliotocária: Ana Pachel Fonsoca de Oliveira

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

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

Assinatura

Data

Camila Luna da Silva

Estudo da morfologia e status oxidativo em rim de ratos com nefropatia isquêmica após tratamento com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 15 de maio de 2020.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Ana Carolina Stumbo Machado (Orientadora) Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a. Dra. Cristiane Matsuura Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a. Dra. Erika Afonso Costa Cortez Marques Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a. Dra. Marcela Anjos Martins Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof^a. Dra. Helene Santos Barbosa Fundação Oswaldo Cruz

> Rio de Janeiro 2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meus pais e ao meu amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me guia e ilumina todos os meus caminhos!

Aos meus pais Juarez e Rosana que sempre me deram apoio e incentivo.

A Renato, meu amor, pelo apoio, carinho e atenção a mim dedicados.

À minha orientadora, professora Ana Carolina, por todos os ensinamentos e carinho. Sempre serei grata pela confiança e por tudo que fez por mim desde os meus tempos de iniciação científica.

À professora Lais de Carvalho, por todos os ensinamentos, confiança e oportunidades profissionais oferecidas a mim. Muito obrigada!!

Às professoras Alessandra Thole, Erika Cortez e Simone Nunes, que também contribuíram e muito na minha formação e que me ensinaram tantas coisas ao longo dessa caminhada.

À professora Cristiane Matsuura e a todos os integrantes do Laboratório de Transporte de Membranas, no Departamento de Farmacologia, por sempre me receberem muito bem no laboratório.

Á professora Marcela Anjos Martins do Laboratório de Transporte de Membranas, no Departamento de Farmacologia, pela ajuda essencial para o desenvolvimento dos experimentos de status oxidativo.

Ao corpo técnico Ana Lúcia, Marcelo, Roberto, Josefa, Kátia, Kíssila, Genilza e Karina. Muito obrigada pelo apoio!

Às Doutoras Rafaelle Lira e Mariana Fernandes, pelos ensinamentos iniciais de quando fui inserida no grupo renal do LPCT.

Ao Thiago Freire, pela ajuda dispensada, principalmente por me ajudar nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão. Foram horas e horas compartilhadas ao microscópio!

A toda equipe do LPCT Daniela, Adriana, Isabelle, Daphne, Aline, Mateus, Filipe, Beatriz, Milena, Yanca, Júlia, Gaby, Giovanna, Rodrigo, Tati, Bruna, por colaborarem nas atividades desenvolvidas, por serem apoio nessa caminhada e pelas risadas nos momentos de descontração.

A Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth pelo uso e obtenção das eletromicrografias

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que não foram citados.

Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós.

RESUMO

SILVA, Camila Luna da. Estudo da morfologia e status oxidativo em rim de ratos com nefropatia isquêmica após tratamento com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo. 2020. 125f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A nefropatia isquêmica é uma doença renal crônica provocada pela redução do fluxo sanguíneo renal que pode progredir para a doença renal terminal, cujo tratamentos disponíveis se baseiam em terapias substitutivas da função renal, como diálise ou transplante renal. No entanto, devido ao alto custo dos tratamentos e a carência de órgãos, se faz necessária a busca por novas terapias, como as célulastronco (CT). Apesar do potencial terapêutico das CT em doenças crônicas, não está claro se essas células mantêm seus efeitos benéficos em órgãos lesionados por tempo prolongado. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos precoces e tardios do tratamento com células-tronco adiposas (CTA) sobre a morfologia e o status oxidativo em rins de ratos com nefropatia isquêmica. A isquemia renal foi induzida pelo modelo 2rins-1clip (2R1C) e, depois de um mês da clipagem da artéria renal, foram injetadas 10⁶ células-tronco na região subscapsular do rim afetado. Após 15 e 30 dias da injeção das CTA, a morfologia renal foi verificada por meio da análise macroscópica, microscópica e ultraestrutural. Além disso, o status oxidativo foi avaliado no tecido renal através da mensuração da atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutationa peroxidase; e de marcadores biológicos de dano oxidativo, como proteínas carboniladas, 3-Nitrotirosina e 4-Hidroxinonenal. Por imunoperoxidase foi possível localizar as células-tronco adiposas GFP+ foram rastreadas e encontradas tanto 15 dias, quanto 30 dias após a injeção na região subcapsular. A restauração da arquitetura renal foi evidenciada 15d após o uso das células, onde detectamos redução na deposição de fibras colágenas no parênquima renal, o que não foi observado 30d após o uso das células. Os resultados também foram confirmados através da análise da ultraestrutura renal que mostraram restauração da arquitetura renal no grupo de 15d, não evidenciada no grupo de 30d. Quanto a análise do status oxidativo, somente os animais com nefropatia isquêmica mais prolongada apresentaram estresse oxidativo com redução da atividade da enzima antioxidante catalase no tecido renal. Além disso, foi observado dano proteico e lipídico, sem melhora dessa condição nos animais 30d após o tratamento com as células-tronco. No modelo de nefropatia isquêmica avaliado, o tratamento com CTA mostrou benefícios na morfologia renal a curto prazo, mas não tardiamente, apesar da permanência dessas células no tecido. Acreditamos que o estresse oxidativo, evidenciado somente no tecido renal com isquemia mais prolongada, possa ter dificultado a ação das células-tronco, contribuindo para tais achados. Esses resultados abrem perspectivas para o aprofundamento do estudo quanto à caracterização dos mecanimos de ação das CTA nas respostas anti-fibrogênicas, assim como o estabelecimento do número, frequência, vias de administração e melhor momento para uso dessas células no tratamento de doencas renais crônicas.

Palavras-chave: Células-tronco adiposas. 2R1C. Nefropatia isquêmica. Estresse oxidativo. Ultraestrura.

ABSTRACT

SILVA, Camila Luna da. Study of morphology and oxidative status in kidney of rats with ischemic nephropathy after treatment with adipose tissue mesenchymal stem cells. 2020. 125f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Ischemic nephropathy is a chronic kidney disease caused by reduced kidney blood flow that can progress to end stage kidney disease, whose available treatments are based on kidney function replacement therapies, such as dialysis or kidney transplantation. However, due to the high cost of treatments and the lack of organs, it is necessary to search for new therapies, such as stem cells (SC). Despite the therapeutic potential of SC in chronic diseases, it is unclear whether these cells maintain their beneficial effects on injured organs for a long time. The aim of this study was to evaluate the early and late effects of adipose-derived stem cells (ADSC) treatment on the morphology and oxidative status in kidneys of rats with ischemic nephropathy. Renal ischemia was induced by the 2kidneys-1clip (2K1C) model and, after a month of clipping the renal artery, 10⁶ stem cells were injected into the subscapsular region of the affected kidney. After 15 and 30 days of ADSC injection, renal morphology was verified by macroscopic, microscopic, and ultrastructural analysis. In addition, oxidative status was assessed in renal tissue by measuring the activity of the antioxidant enzymes catalase and glutathione peroxidase; and biological markers of oxidative damage, such as carbonylated proteins, 3-nitrotyrosine and 4hydroxynonenal. By immunoperoxidase, it was possible to locate GFP + adiposederived stem cells that were tracked and found both 15 days and 30 days after injection in the subcapsular region. The restoration of the renal architecture was evidenced 15d after the use of the cells, where we detected a reduction in the deposition of collagen fibers in the renal parenchyma, which was not observed 30d after the use of the cells. The results were also confirmed by analyzing the renal ultrastructure, which showed restoration of the renal architecture in the 15d group, not evidenced in the 30d group. Regarding the analysis of oxidative status, only animals with more prolonged ischemic nephropathy presented oxidative stress with reduced activity of the antioxidant enzyme catalase in renal tissue. In addition, protein and lipid damage was observed, with no improvement in this condition in the animals 30d after treatment with stem cells. In the evaluated ischemic nephropathy model, treatment with ADSC showed benefits in renal morphology in the short term, but not late, despite the permanence of these cells in the tissue. We believe that oxidative stress, evidenced only in renal tissue with more prolonged ischemia, may have hindered the action of stem cells, contributing to such findings. These results open perspectives for further study on the characterization of ADSC mechanisms of action in anti-fibrogenic responses, as well as the establishment of the number, frequency, routes of administration and the best time to use these cells in the treatment of chronic kidney diseases.

Keywords: Adipose-derived stem cells. 2K1C. Ischemic nephropathy. Oxidative estresse. Ultraestructure.

LISTA DE FIGURAS

22 gma 23 25 27
gma 23 25 27
23 25 27
25 27
27
ar a
29
ante
32
ее
34
36
37
39
41
46
47
52
do 53
54
55
57
66
68
69
ı e
70
76
78
80

Figura 27 -	Fotomicrografias de rim do grupo 6 semanas corados por ácido	
	periódico-Schiff	82
Figura 28 -	Fotomicrografias de rim do grupo 8 semanas corados por ácido	
	periódico-Schiff	84
Figura 29 -	Fotomicrografias de rim do grupo 6 semanas corado com Picro	
	Sirius Red	86
Figura 30 -	Fotomicrografias de rim do grupo 8 semanas corado com Picro	
	Sirius Red	87
Figura 31 -	Fotomicrografia da CTA GFP+ no rim no grupo 6 semanas	89
Figura 32 -	Fotomicrografia da CTA GFP+ no rim no grupo 8 semanas	90
Figura 33 -	Eletromicrografia da ultraestrutura da barreira de filtração	
	glomerular	92

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Histograma representativo da citometria de fluxo	67
Gráfico 2 -	Evolução da pressão arterial sistólica (PAS)	71
Gráfico 3 -	Volume urinário	72
Gráfico 4 -	Níveis plasmáticos de creatinina	74
Gráfico 5 –	Níveis plasmáticos de ureia	75
Gráfico 6 -	Níveis de proteínas totais	75
Gráfico 7 -	Porcentagem de fibras colágenas no parênquima renal	88
Gráfico 8 -	Atividade da catalase renal	93
Gráfico 9 -	Atividade da glutationa peroxidase renal	94
Gráfico 10 -	Quantificação de proteínas carboniladas	95
Gráfico 11 -	Quantificação da 3-Nitrotirosina	96
Gráfico 12 -	Quantificação da 4-Hidroxinonenal	97

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Ensaios clínicos que utilizam CTA no tratamento da doença	
	renal	42
Tabela 1 -	Evolução da pressão arterial sistólica (PAS)	71
Quadro 2-	Análise semiquantitativa da urina	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2R1C	2 Rins - 1Clipe
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de Variância
BRAs	Bloqueadores dos receptores de angiotensina II (AT1R).
CAT	Catalase
Cl	Íon Cloreto
CO ₂	Dióxido de carbono.
СТ	Célula-tronco
СТА	Célula-tronco adiposa
CTE	Célula-tronco embrionária
СТН	Célula-tronco hematopoiética
СТМ	Célula-tronco mesenquimal
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DRC	Doença renal crônica
EAR	Estenose da artéria renal
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
Fe++	Íon Ferro
GFP	Proteína verde fluorescente
GPx	Glutationa peroxidase.
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio.
HRV	Hipertensão renovascular
IL-10	Interleucina 10.
INF2	Proteína formin-2 invertido.
iPSC	Células-tronco de pluripotência induzida
K+	Íon Potássio
MBG	Membrana basal glomerular
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão.
Na+	Íon Sódio

NADPH	Nicotinamidas adenina dinucleotideo fosfato.
NO	Óxido nítrico.
O2*-	Radical superóxido.
·OH	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito.
P1	Primeira passagem.
P2	Segunda passagem.
P3	Terceira passagem.
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão fosfato salino
SBF	Soro bovino fetal
SNC	Sistema nervoso simpático.
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
ТА	Tecido adiposo.
TCD	Túbulo contorcido distal
TCP	Túbulo contorcido proximal
TRPC6	Receptor transitório potencial do canal de cátions, subfamília C, membro
	6.

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1	Histologia e fisiologia renal	19
1.2	Doença renal isquêmica	27
1.3	Estresse oxidativo e doença renal	30
1.4	Terapia celular com células-tronco	33
1.5	Células-tronco de tecido adiposo	37
1.6	Células-tronco de tecido adiposo e reparo renal	40
2	JUSTIFICATIVA	43
3	OBJETIVOS	44
3.1	Gerais	44
3.2	Específicos	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	Animais	45
4.2	Isolamento e manutenção das CTA de ratos	45
4.3	Caracterização morfológica das CTA	47
4.4	Caracterização imunofenotípica das CTA por citometria de	
	fluxo	48
4.5	Ensaio de diferenciação	48
4.6	Identificação das CTA por imunofluorescência	50
4.7	Grupos experimentais	51
4.8	Indução da nefropatia isquêmica	52
4.9	Injeção de CTA na região subcapsular renal	53
4.10	Monitoramento da pressão arterial	54
4.11	Análise bioquímica	55
4.11.1	Volume urinário e uroanálise	56
4.11.2	Quantificação da creatinina no plasma	57
4.11.3	Quantificação da ureia no plasma	58
4.11.4	Quantificação das proteínas totais do plasma	58
4.12	Análise do parênquima renal por microscopia de luz	58
4.12.1	Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)	59

4.12.2	<u>Coloração Ácido Periódico – Schiff</u> 6	0
4.12.3	Coloração Picro Sirius Red	0
4.13	Análise quantitativa de colágeno6	0
4.14	Localização das células CTA GFP+ no rim por	
	imunoperoxidase	0
4.15	Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão	
	(MET)	1
4.16	Análise do status e dano oxidativo por espectrofotometria6	2
4.16.1	Mensuração da atividade da Catalase6	3
4.16.2	Mensuração da atividade da glutationa peroxidase6	3
4.16.3	Mensuração das proteínas carboniladas6	3
4.17	Mensuração de marcadores de dano oxidativo por western	
	blotting	4
4.18	Análise estatística	5
5	RESULTADOS	6
5.1	Morfologia das CTA	6
5.2	Caracterização imunofenotípica da CTA por citometria de	
	fluxo	7
5.3	Identificação das CTA por imunofluorescência6	8
5.4	Diferenciação <i>in vitr</i> o das CTA nas linhagens adipogênica e	
	osteogênica6	9
5.5	Análise da pressão arterial sistólica dos animais	0
5.6	Volume urinário e análise bioquímica	2
5.7	Quantificação da creatinina, ureia e proteínas totais do plasma 7	4
5.8	Análise macroscópica do rim	6
5.9	Análise do parênquima renal por microscopia de luz	7
5.10	Marcação das fibras colágenas8	5
5.11	Quantificação das fibras colágenas8	8
5.12	Localização das células CTA GFP+ no rim por imunoperoxidase 8	9
5.13	Análise da ultraestrutura renal	0
5.14	Mensuração da atividade das enzimas antioxidantes e dano	
	oxidativo	3

6	DISCUSSÃO	98
	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIA	110
	ANEXO - Comissão de ética para o cuidado e uso de animais	
	experimentais	125

INTRODUÇÃO

A doença renal crônica é um importante problema de saúde pública, em virtude de sua crescente prevalência estar associada à estenose da artéria renal (EAR) que ocorre em consequência das elevadas taxas de obesidade, idade avançada, diabetes, dislipidemia, tabagismo e doenças cardiovasculares que são fatores que favorecem a formação da placa aterosclerótica na artéria renal.A Hipertensão renovascular (HRV) é a primeira manifestação clínica perceptível da EAR. A segunda manifestação comum a EAR é a nefropatia isquêmica, ambas as manifestações são consequência da redução do fluxo sanguíneo no rim que leva a ativação do sistema renina angiotensina-aldosterona, que acarreta na elevação da pressão arterial e na ativação de vias complexas e interligadas que acarretam na perda microvascular, estresse oxidativo, inflamação e fibrose no rim que levam danos no parênquima renal.(OLIVEIRA-SALES & BOIM 2016; ROMAGNAN et al., 2017; SALAME et al., 2012).

O rim possue grande quantidade de mitocôndrias nos túbulos contorcidos proximais, sendo assim um orgão particularmente sensível ao desequilíbrio redox.Quando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) supera os mecanismos de defesa antioxidantes, o resultado é o estresse oxidativo, que pode levar a danos efetivos no DNA, proteínas e lipídios das células. As ERO estão envolvidas na ativação de mediadores inflamatórios, possuindo importância significativa na ativação da via pró-inflamatória. Além disso, as ERO podem estimular a produção e a atividade de fatores de crescimento que modulam a resposta do tecido renal a deposição de colágeno. O acúmulo excessivo de colágeno na matriz extracelular leva ao desenvolvimento da fibrose renal. Sendo assim, o estresse oxidativo é um fator patogênico para o início, desenvolvimento e progressão dos danos renais que podem levar a doença renal em fase terminal (GORIN, 2016; GUIMARÃES-SOUZA et al., 2015; LERMAN et al., 2009).

Dada a capacidade limitada de regeneração do rim, a sobrevida de pacientes com lesão renal em estágio avançado baseia-se exclusivamente em terapias substitutivas como diálise ou transplante, e ambos os tratamentos estão associados com o aumento da morbidade e mortalidade. Outro agravante é a limitada disponibilidade de órgãos e necessidade de tratamento imunossupressor ao longo da vida em casos de realização do transplante. De acordo com os dados publicados pela Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), o número de pacientes na lista de espera excede ao número de órgãos disponíveis para doação. Portanto, a carência de órgãos, dentre outros fatores, limita esse tratamento e leva à necessidade iminente do desenvolvimento de novas terapias funcionais (HERRERA & MIROTSOU, 2014; OLIVEIRA-SALES & BOIM, 2016; ZHONG, YANG & FOGO, 2017).

Nos últimos anos a terapia celular com células-tronco mesenquimais tem se apresentado como uma estratégia terapêutica promissora para várias doenças, entre elas as doenças renais. Estudos pré-clínicos demonstraram efeitos benéficos de várias populações de células-tronco e de fatores secretados por estas células, como fatores de crescimento, exossomos e microvesículas, em modelos de lesão renal, sugerindo um efeito regenerativo no rim, em modelos de terapia celular. Analisandose o número limitado de estratégias que controlam eficazmente a DRC e restauração da função renal, propõe-se que a terapia celular com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo pode ser uma alternativa promissora baseada nas suas propriedades regenerativas (LIRA et al., 2017; OLIVEIRA-SALES & BOIM, 2016; PEIRED et al., 2016; SUZUKI et al., 2016).

O tecido adiposo apresenta-se como uma excelente fonte de células-tronco mesenquimais uma vez que podem ser obtidas de lipoaspirados, que são rotineiramente descartados. Uma pequena amostra de tecido adiposo contém uma quantidade significativa de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTA) com grande capacidade proliferativa, o que exclui a cultura *in vitro* a longo prazo, reduzindo assim o risco de anormalidades cromossômicas. Além disso, as CTA não expressam moléculas de MHC – classe II, tendo assim ausência de rejeição no receptor, o que favorece o uso em tratamentos com células alogênicas (BAJEK et al.; 2016; KOCAN et al., 2017; PEIRED et al., 2016). Portanto, o presente trabalho se propôs a avaliar a morfologia e o status oxidativo em rim de ratos com nefropatia isquêmica tratados com CTA.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Histologia e fisiologia renal

O sistema urinário é formado por dois rins, dois ureteres, a bexiga e a uretra. Os rins desempenham importante função para a manutenção da homeostase do indivíduo por meio da filtração do sangue, promovendo a absorção e excreção de água, eletrólitos e não eletrólitos em excesso no organismo, bem como a eliminação de resíduos metabólicos. Além disso, os rins possuem atividade endócrina, produzindo e secretando renina, que participa na regulação da pressão arterial e do volume sanguíneo; e eritropoetina, que regula a formação de hemácias na medula óssea. Participam ainda em conjunto com a pele e o fígado, na ativação da vitamina D3, importante para o metabolismo do cálcio (CESAREO et al.,2019; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 201; ROSS, 2016; WANG & GARRETT, 2017).

Os rins estão localizados na cavidade abdominal, no espaço retroperitoneal. Apresentam uma borda convexa e outra côncava na qual se situa o hilo, por onde entram e saem vasos sanguíneos, plexo nervoso e sai o ureterer que conduz a urina produzida no rim até a bexiga. O rim é recoberto por uma cápsula de tecido conjuntivo composto por fibroblastos, miofibroblastos e fibras colágenas, que conferem resistência ao órgão quando ocorrem variações de volume e de pressão durante a função renal. A unidade morfofuncional do rim é o túbulo urinífero formado pelo néfron e o túbulo coletor. Em cada rim há cerca de 600 a 800 mil néfrons. Cada néfron é composto por corpúsculo renal, túbulo contorcido proximal (TCP), alça de Henle e túbulo contorcido distal (TCD). Histologicamente observam-se duas regiões bem delimitadas no rim: o córtex e a medula. No córtex localizam-se os corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais, e a medula é composta pela alça de Henle, túbulos e ductos coletores e uma rede especial de capilares, os vasos retos (Figura 1) (FARRIS et al., 2016; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; LÓPEZ et al.2015; ROSS, 2016 ; WANG & GARRETT, 2017).



Figura 1 - Representação esquemática do rim

Legenda: (A) Organização macroscópica do rim; (B) Detalhe das regiões cortical e medular; (C) Destaque para o néfron com seus segmentos: corpúsculo renal composto pelo glomérulo e cápsula de Bowman, Túbulo proximal (TCP), Túbulo distal (TCD) e alça de Henle; (D) Detalhe do epitélio da parede do TCP; (E) Esquema da região da borda em escova do TCP com vários transportadores envolvidos no processo de reabsorção. Fonte: Adaptado de WESSELY et al., 2014.

O corpúsculo renal ou de Malpighi, primeiro segmento do néfron, localiza-se no córtex e é constituído pelo glomérulo e pela cápsula de Bowman que o reveste. O glomérulo é composto por um tufo de capilares sanguíneos revestidos de células endoteliais fenestradas e células mesangiais. A cápsula de Bowman apresenta duas camadas: a parietal, formada pelo epitélio simples pavimentoso associado ao tecido conjuntivo; e a visceral, revestida por células especializadas chamadas de podócitos, localizadas junto aos capilares glomerulares. Entre estas duas camadas existe um espaço capsular que recebe o ultrafiltrado glomerular que, posteriormente, segue para os túbulos renais. Cada corpúsculo renal apresenta um pólo vascular e um pólo urinário. O pólo vascular é a região por onde a arteríola aferente penetra e se ramifica para formar os capilares do glomérulo e que depois se unem novamente formando a arteríola eferente. O polo urinário, recolhe o ultrafiltrado por meio do o TCP (Figura

2A) (GRAHAMMER, 2017; KITCHING & HUTTON, 2016; NDISANGL, 2018; ROSS, 2016; SCOTT & QUAGGIN, 2015).

Os capilares glomerulares são envolvidos por células especializadas, podócitos, que apresentam corpo celular grande e arredondado de onde partem ramificações, chamadas de prolongamentos primários e secundários, também denominados de pedicelos. Estes prolongamentos se intercalam, formando interdigitações, e se ancoram externamente na membrana basal dos capilares pela integrina α3β1, o principal heterodímero expresso na superfície dos podócitos. A face interna da membrana basal glomerular (MBG) é revestida por endotélio capilar do tipo fenestrado, que permite que o fluido passe pelas fenestras e em seguida pela MBG, a qual impede a passagem de solutos de grande peso molecular. Depois da MBG o fluido atravessa as fendas de filtração, espaço físico entre as interdigitações dos pedicelos. Nessa região existe o diafragma da fenda, uma fina membrana que tem a função de impedir a passagem de moléculas menores do ultrafiltrado plasmático. Assim a barreira de filtração glomerular é composta por três estruturas: endotélio fenestrado MBG e pedicelos. (Figura 2B) (KIERSZENBAUM & TRES, 2012; LENNON et al., 2014; NDISANGL, 2018; OVALLE & NAHIRNEY, 2008; POLLAK et al., 2014).



Figura 2 - Representação esquemática do corpúsculo renal

Legenda: (A) A cápsula de Bowman é revestida com o folheto parietal, que dá lugar às células do túbulo contorcido proximal no pólo urinário à direita. À esquerda, o pólo vascular do glomérulo inclui as arteríolas aferentes e eferentes. Além disso, é ilustrada a relação entre essas arteríolas e a porção especializada do néfron distal chamada mácula densa. (B) A barreira de filtração glomerular é composta por endotélio fenestrado, membrana basal glomerular e podócitos. Fonte: Adaptado de POLLAK et al.,2014.

A barreira de filtração permite a livre passagem de água e pequenos solutos para a formação do ultrafiltrado, mas impede a perda de componentes importantes como macromoléculas ou células do sangue. A MBG é composta por uma rede de colágeno tipo IV, essencial para manter a integridade da membrana e atuar como uma barreira física; laminina e fibronectina, que atuam na associação da MBG das células endoteliais com os podócitos; bem como os proteoglicanos de heparam sulfato, como a agrina e o perlecam, que impedem a passagem de moléculas de carga negativa; além do nidogênio e entactina. São componentes do diafragma da fenda de filtração a nefrina, podocina, α-actinina-4, INF2 e TRPC6, que interagem com os pedicelos e com a fenda glomerular, sendo responsáveis pela integridade da estrutura podocitária,

e consequentemente, pelo funcionamento adequado da barreira de filtração (Figura 3) (GRAHAMMER, 2017; LENNON et al., 2014; ROSS, 2016).



Figura 3 - Principais componentes moleculares dos pedicelos e diafragma da fenda

A nefrina e a podocina são expressas apenas no podócito, sendo a podocina, uma proteína importante no recrutamento de outras proteínas, além de facilitar a sinalização celular da região. A nefrina é uma proteína transmembrana dos pedicelos que se ancora aos filamentos de actina através da podocina., com isso a nefrina mantém a estabilidade do citoesqueleto e, consequentemente, a integridade da estrutura do podócito, além de atuar retardando a passagem de moléculas. Alterações nas proteínas reguladoras de actina amplamente expressas α-actinina-4 e INF2 levam à disfunção podocitária. Assim como, mutações no canal catiônico TRPC6 causam uma forma autossômica dominante fenotipicamente semelhante a glomeruloesclerose segmentar focal. Já modificações na nefrina podem causar a síndrome nefrótica congênita, e uma redução da sua expressão parece estar associada à proteinúria, provocada por danos aos podócitos, como ocorre na doença renal crônica (BARTON et al., 2015; GRAHAMMER, 2017; LENNON et al., 2014; ROSS, 2016).

Legenda: Podócitos interdigitantes de células vizinhas formam o diafragma de fenda que é composto de nefrina. A podocina ajuda a regular o tráfico de nefrina para o diafragma da fenda. As proteínas α-actinina-4 e INF2 desempenham papéis importantes na manutenção do citoesqueleto de actina, enquanto as integrinas ajudam a ancorar os pedicelos na membrana basal globe Politica de contractor de

Fonte: Adaptado de POLLAK et al.,2014.

No corpúsculo renal, ainda podem ser encontradas as células mesangiais que são células intimamente associadas à MBG dos capilares glomerulares. Produzem matriz mesangial extracelular, que fornece sustentação estrutural aos podócitos e mantém a integridade do glomérulo. Sintetizam e secretam diferentes moléculas bioativas como prostaglandina, endotelina e agentes vasoativos, além de processar, por endocitose, proteínas plasmáticas e remover resíduos retidos na MBG. Apresentam propriedades contráteis que contribuem para o controle da taxa de filtração glomerular, por meio da ativação de receptores para angiotensina II e aldosterona. Evidências apontam que a lesão podocitária provoca alterações nas células mesangiais, levando a proliferação destas células, perda da matriz mesangial, seguida de deposição excessiva de matriz extracelular, produção de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas e enzimas as quais participam do processo de fibrose glomerular renal. Portanto, as células mesangiais atuam na regulação funcional e no remodelamento do tecido renal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; KURIHARA & SAKAI, 2017; ZHAO, 2019).

O segundo segmento do néfron é o TCP que possui parede formada por tecido epitelial cúbico simples com borda em escova. As células do TCP apresentam microvilosidades no domínio apical e citoplasma de aspecto acidófilo devido à grande quantidade de mitocôndrias alongadas e dispostas longitudinalmente nas invaginações da membrana plasmática do domínio basal, criando um padrão de estriações basais. (Figura 4A). As mitocôndrias produzem energia necessária para a reabsorção de íons por transporte ativo. O grande aporte mitocondrial torna o TCP particularmente vulnerável a lesões obstrutivas e isquêmicas, por ser suscetível à interferência nas vias oxidativas e metabólicas, que resultam em morte celular e fibrose caracteristica em doenças renais crônicas. O ultrafiltrado recolhido na cápsula de Bowman é transportado para o TCP, onde ocorre reabsorção de cerca de 70% da água, íons sódio (Na+) e cloreto (CI-), e excreção de resíduos do metabolismo, como a creatinina, a ureia e ácido úrico. (CHEVALIER, 2016; GEWIN, 2018; ROSS, 2016; SEKI et al.2015).

A alça de Henle é o terceiro segmento do néfron, crucial para a produção de urina hipertônica, retendo a água conforme as necessidades do organismo. É composta por um ramo descendente e de um ramo ascendente (Figura 4B). Em cada ramo observa-se um segmento espesso, que apresenta epitélio cúbico simples, e um segmento delgado, epitélio pavimentoso simples. É nesse componente do néfron

onde ocorrerá a maior parte da concentração da urina, por meio da reabsorção de água. Também ocorre o controle de cálcio, magnésio, bicarbonato e de amônia (GRAHAM et al., 2017; MOUNT 2014; ZACCHIA et al., 2018).

O TCD compreende a porção final do néfron, formado por epitélio cúbico simples, sem borda em escova, impermeável à água e à ureia, que se localiza entre a mácula densa e o túbulo coletor (Figura 4C). Embora seja o segmento mais curto do néfron, desempenha um papel crítico em uma variedade de processos como a reabsorção de cloreto de sódio, secreção de potássio e homeostase sistêmica do cálcio e magnésio. Na porção inicial deste túbulo, adjacente ao corpúsculo renal e próximo às arteríolas aferente e eferente, existem algumas células colunares com polaridade invertida, chamadas de mácula densa (MCCORMICK & ELLISON, 2015; SUBRAMANYA & ELLISON, 2014).



Figura 4 – Túbulos renais

Legenda:(A) Corte histológico do córtex renal mostrando os túbulos contorcidos proximal (TCP) e distal (TCD) próximo ao corpúsculo renal (CR); (B) Corte histológico da medula renal mostrando os TCP, TCD e alça de Henle (AH); (C) Esquema do túbulo urinífero e sua morfologia em corte transversal. Fonte: FERNANDES, 2017 e GARTNER & HIATT, 2011. As células da mácula densa são altas e estreitas localizadas bem próximas umas das outras outras, com núcleo mais próximo do lúmen e Golgi situado entre o núcleo e a superfície basal da célula. Essas células possuem contato direto com as células justaglomerulares, que são células musculares lisas localizadas na parede das arteríolas aferentes, produtoras de renina. Preenchendo o espaço triangular formado entre a mácula densa e arteríolas aferente e eferente localiza-se as células mesangiais extraglomerulares que com a mácula densa e células justaglomerulares constituem o aparelho justaglomerular, que está envolvido no processo de autorregulação do fluxo sanguíneo renal e de filtração glomerular (DE MORAES et al., 2018; GARTNER & HIATT, 2011; MARTINI & DANSER, 2017; NISHIMURA. 2017).

A função do aparelho justaglomerular está diretamente ligada à atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que desempenha papel importante na homeostase cardiovascular, na regulação dos fluidos corporais e no balanço eletrolítico e recentemente foi implicado como regulador metabólico. É essencial para a manutenção da pressão arterial sistêmica (PAS). Quando ocorre uma redução do volume vascular e, assim, diminuição da taxa de filtração glomerular e da concentração de Na+Cl⁻ no filtrado, as células da mácula densa detectam a redução de Na+Cl⁻ e sinalizam a liberação de renina pelas células justaglomerulares por meio da produção de prostaglandinas e óxido nítrico (DE MORAES et al., 2018; MARTINI & DANSER, 2017; WANG et al., 2014).

A renina catalisa a hidrólise do angiotensinogênio, liberado pelo fígado no plasma, produzindo angiotensina I (Ang I), que por sua vez é convertida em angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA), presente nas células endoteliais dos capilares pulmonares e no rim. A Ang II, principal peptídeo efetor do SRAA, exerce seus efeitos através dos receptores ligantes que podem ser de dois tipos o (AT1R) e o (AT2R), que possuem efeitos opostos. Ao se ligar ao receptor AT1R estimula a secreção de aldosterona pelo córtex da supra-renal (adrenal), que age nos túbulos coletores para aumentar a absorção de Na⁺ Cl⁻ e água, elevando o volume sanguíneo e consequentemente, elevando a PAS. Além disso, a Ang II induz vasoconstrição sistêmica e ativa o sistema nervoso simpático (SNS) (Figura 5). Portanto, uma vez o SRAA em desequilíbrio, há o desenvolvimento de hipertensão, que quando persistente, leva a danos renais, ao desenvolvimento da DRC e ao risco de eventos cardiovasculares (DE MORAES et al., 2018; MARTINI & DANSER, 2017; NISHIMURA. 2017; ZANG et al.,2017).



Figura 5 – Esquema do sistema renina-angiotensina-aldosterona

Legenda: Com a redução do volume sanguíneo e pressão arterial, as células justaglomerulares secretam renina, que atua sobre o angiotensinogênio, liberado pelo fígado, convertendo-o em angiotensina I. Nos pulmões a angitensina I é convertida pela enzima convertora de angiotensina (ECA) em angiotensina II, que promove a vasoconstrição e liberação de aldesterona pela adrenal, hormônio que promove a absorção de Na+ e água, com consequente aumento do volume sanguíneo que associado à vasoconstrição promovem a elevação da pressão arterial.

Fonte: Adaptado de https://www.pinterest.se/pin/743094007252617200/ Acesso em 20 de dez. de 2019.

1.2 Doença renal isquêmica

A doença renal isquêmica (DRI) é caracterizada por redução de fluxo sanguíneo em um ou ambos os rins, sua prevalência é crescente e associada a estenose da artéria renal (EAR) como consequência das elevadas taxas de idade avançada, obesidade, diabetes, dislipidemia, tabagismo e doenças cardiovasculares. A doença aterosclerótica é a causa mais comum de estenose, representando 90% de todas as lesões das artérias renais e predomina em pacientes do sexo masculino com mais de 50 anos de idade. A displasia fibromuscular é outra condição que proporciona a EAR, representando 9% dos casos, principalmente em pacientes do sexo feminino e jovens entre 15 e 40 anos de idade. O 1% restante correspode a trauma mecânico

na região (CHADE, 2018; HAGEMANN et al., 2014; HERRMANN & TEXTOR, 2019; OLIVEIRA-SALES & BOIM, 2016; SALAME et al., 2012).

A EAR pode se manifestar por meio de duas condições clínicas distintas e independentes entre si: a hipertensão renovascular (HRV) e a nefropatia isquêmica (NI). A hipoperfusão renal resulta na liberação de renina pelas células justa glomerulares, e consequente ativação do SRAA já descrito, promovendo assim a HRV. Essa cascata de eventos, também leva a liberação de citocinas inflamatórias e fibrogênicas, como o TGF-β que atua no desenvolvimento da fibrose a qual acarreta a perda da função renal resultando na nefropatia isquêmica (BEZERRA et al., 2016; GEWIN et al., 2017; HERRMANN & TEXTOR, 2019; SCHOEPE et al.,2017; SPARKS et al.,2014).

A EAR prolongada ativa vias complexas e interligadas, que podem agravar o dano renal, com perda de massa funcional, resultando em atrofia renal, perda microvascular, estresse oxidativo e inflamação crônica, que são efeitos da ativação de citocinas pró-inflamatórias ao aumento dos mediadores inflamatórios NF-K β e TNF- α , que potencialmente levam à fibrose renal, que constitui destino final e comum da doença renal crônica (Figura 6). Independentemente da etiologia, frequentemente agrava para doença renal terminal, que está relacionada a grandes taxas de morbimortalidade, em virtude da sua associação a doenças cardiovasculares. É uma condição que gera altos custos para saúde pública devido à falta de estratégias terapêuticas eficazes para curar ou retardar a progressão da doença, fazendo com que o paciente necessite de terapias substitutivas como diálise e transplante renal em estágios avançados (CHADE, 2018; DALOUL & MORRISON, 2016; DUANN & LIN, 2017; LERMAN et al., 2009; HERRMANN & TEXTOR, 2019; ROMAGNAN et al.2017; ZHANG, et al., 2016).



Figura 6 - Interação de vias pelas quais a aterosclerose pode agravar a lesão renal

Legenda: A angiotensina II e as espécies reativas de oxigênio (ERO) regulam a expressão de trombospondina (TSP), fator de crescimento transformador (TGF) -β e inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz (TIMP), levando a uma diminuição das metaloproteinases da matriz (MMP), acúmulo de matriz extracelular e fibrose. Respostas imunes e mediadores inflamatórios, como fator nuclear kappa B (NFκB), proteína quimioatraente de monócitos (MCP -1) e fator de necrose tumoral (TNF-α), contribuem para aumentar o estresse oxidativo, formação de LDL-oxidado (LDL-OX), e fibrose. As ERO também eliminam o óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito (ONOO-), induzindo assim disfunção endotelial e perda dos efeitos vasoprotetores do NO. Mecanismos semelhantes levam à perda microvascular. Fonte: Adaptado de LERMAN et al.,2009.

Os tratamentos disponíveis para EAR incluem vigorosa redução do risco aterosclerótico como controle da pressão arterial, uso de estatinas para redução da dislipidemia, controle da glicemia, controle do tabagismo e uso de aspirina. A terapia anti-hipertensiva que consiste na utilização de agentes bloqueadores do SRAA, como inibidor da enzima de conversão de angiotensina ou terapia com bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRAs), apresenta efeitos controversos e não responsivos em todos os pacientes. Em pacientes com EAR de maior risco são utilizados stents para revascularização renal, que não proporciona efeitos benéficos e consistentes na função renal, principalmente quando o dano renal já está bem estabelecido. Nesse caso, terapias direcionadas ao tratamento da inflamação possuem resultados satisfatórios na preservação da estrutura e função renal (EIRIN, TEXTOR & LERMAN, 2019; HERRMANN & TEXTOR, 2019; HOLZGREVE, 2016; OLIVEIRA-SALES et al., 2015; SAAD et al., 2015; VASSALLO et al., 2017).

1.3 Estresse oxidativo e doença renal

Durante o metabolismo do oxigênio e do nitrogênio diversas moléculas biologicamente reativas são produzidas de forma contínua pelas células. As espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitogênio (ERN) são indispensáveis na regulação e sinalização de várias funções celulares. No entanto, com estímulo inadequado, a homeostase redox pode ser destruída, induzindo a uma série de reações prejudiciais que levam a condições patológicas, onde as ERO estabelecem ligações com componentes celulares pelas reações de óxido-redução, que promovem alterações bioquímicas e perda de função celular. Para proteção do organismo, o nível de espécies reativas é mantido em equilíbrio por mecanismos de defesas antioxidantes, que neutralizam a ação deletéria dessas moléculas. O desiquilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes leva o organismo ao estresse oxidativo. O efeito do estresse oxidativo ao organismo é o dano oxidativo. (CAMPOS & LEME, 2018; DA COSTA, 2012; GUIMARÃES-SOUZA et al.,2015; KATTOOR et al., 2017; SIES, 2015; SOUSA et al., 2019).

Existem quatro principais fontes de ERO no organismo, todas envolvidas em doenças renais, a nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADPH) oxidase; as mitocôndrias; o oxido nítrico sintases (NOS) e xantina oxidades. Na fosforilação oxidativa, que ocorre na respiração celular aeróbia, ocorre a redução do oxigênio molecular na mitocôndria com a formação de água, assim como a formação de várias ERO com destaque para o radical superóxido (O_2^{-}), o radical hidroxila ('OH), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por ser uma molécula mais estável, não é uma espécie reativa. (FISCHBACHER et al.,2017; LIPINSKI, 2011; SU et al., 2019; TOGLIATTO et al.,2017).

O tipo de mecanimos de lesão celular provocada é atribuído a toxicidade de cada espécie reativa. O O₂⁻, são consideradas espécies pouco reativas, principalmente em reações aquosas. É impermeável a membrana, porém pode utilizar canais iônicos para atravessar membrans celulares. Quando produzido em excesso, reage com o oxido nítrico (NO), produzindo peroxinitrito (ONOO⁻), que é uma ERN, potente que converte resíduos de tirosina em 3-nitrotirosina, além disso pode causar fragmentação do DNA e oxidação lipídica (CAMPOS & LEME, 2018; DA COSTA, 2012, SU et al., 2019).

O H₂O₂, é um subproduto da respiração celular, que pode atravessar facilmente as membranas celulares por ser lipossolúvel .apesar de não ser uma espécie reativa, possui efeito extremamente deletério ao organismo, uma vez que pode gerar radicais OH⁻⁻, na presença de ions ferro, e ainda pode realizar ligações com proteínas carreadoras de ferro, potencializando seu caráter oxidativo (CAMPOS & LEME, 2018; DA COSTA, 2012).

O 'OH é extremamente reativo, possuindo alto potecial deletério para as membranas celulares, ao se ligar com metais ou outros radicais pode gerar danos ao metabolismo celular, incluindo mutações no DNA por alteração em bases nitrogenadas, inativação de proteínas e enzimas devido a ligações com grupamentos proteicos sulfidrilas e pontes dissulfeto, além de iniciar a oxidação de ácidos graxos em membranas celulares, que leva a peroxidação lipídica que ocasiona a perda de seletividade da membrana comprometendo a função celular (CAMPOS & LEME, 2018; DA COSTA, 2012).

O mecanismo de defesa antioxidante do organismo é composto por agentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx). A SOD é a principal enzima antioxidante para remoção de superóxido ela catalisa a desmutação de O₂⁻⁻ em H₂O₂, que será posteriormente convertido em água e oxigênio pela CAT ou GPx (Figura 7). A vitamina A (Beta Caroteno), vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina E (Alfa tocoferol), Cobre, Zinco, Manganês e Selênio compõem as subtâncias antioxidantes não-enzimáticas (AMORIM et al., 2019; CAMPOS & LEME, 2018; GUIMARÃES-SOUZA et al., 2015; KEHRER & KLOTZ, 2015; TOGLIATTO et al., 2017).



Figura 7 – Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante enzimáticos

Legenda: Insultos podem aumentar a produção de EROs no citoplasma e nas mitocôndrias. A NADPH oxidase também contribui para a produção de EROs. A produção de EROs pode causar danos às proteínas, lipídeos e DNA da célula. As EROs ativam o fator nuclear 2 relacionado ao eritroide (NRF2), que se transloca o núcleo para ativar a transcrição de genes que codificam a superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx). A SOD reduz os anions superóxido em peroxido de hidrogênio (H2O2) e oxigênio (O2). A CAT encontrada no citoplasma, e a GPX, localizada no citoplasma e mitocôndrias, reduzem o H2O2 em água (H2O). A GPX também oxida a glutationa (GSH) resultando em dissulfeto de glutationa (GSSG), como um subproduto da redução do peroxido de hidrogênio na água. O GSSG nas mitocôndrias é convertido novamente em GSH pela glutationa redutase (GR) na presença de NADPH.

Fonte: Adaptado de AMORIM et al.,2019.

O rim é um órgão vital envolvido em várias funções responsáveis pela manutenção da homeostase do organismo como equilíbrio ácido-base e eletrólitos, regulação da pressão arterial, reabsorção de nutrientes e secreção hormonal. Para atender à demanda energética necessária para a realização das suas funções o rim possui muitas mitocôndrias, sendo assim um orgão particularmente sensível ao desequilíbrio redox resultante da produção excessiva de ERO. O estresse oxidativo é um dos principais componentes que contribuem para a fibrose renal, que é um fator comum que leva a doença renal terminal, sendo assim importante para o início,

desenvolvimento e progressão da maioria das doenças renais agudas e crônicas (AMORIM et al.,2019; BHARGAVA et al.,2017; DUANN & LIN, 2017; GORIN, 2016; SU et al., 2019).

Na doença renal isquêmica ocorre a superativação do SRAA, que leva a síntese exacerbada de Ang II, que induz o aumento da pressão arterial sistêmica e intraglomerular. A HRV acarreta injuria celular que leva ao aumento das ERO, assim como a níveis elevados de Ang II promovem a ativação de (NADPH) oxidase. A identificação de subunidades homólogas à gp91phox resultou na formação da família Nox que é composta por sete integrantes, que são responsáveis por regular alguns processos biológicos, além de serem fonte de produção de ERO (AMORIM et al., 2019; ILATOVSKAYA et al., 2018; JHA et al., 2016; MENG et al., 2018; RAJARAM et al., 2019; WAN et al., 2016)

A família Nox é composta por sete membros, sendo a Nox4 expressa principalmente no rim e está envolvida no progresso de muitas patologias renais. Sua ativação anormal induzida por Ang II resulta em superprodução e acúmulo de H₂O₂, que por sua vez ativam os canais TRPC6 e estimulam o influxo de cálcio para as células provocando a hipertrofia, fusão podocitária e apotose, sendo o EO uma condição importante na progressão da doença renal (AMORIM et al., 2019; ILATOVSKAYA et al., 2018; JHA et al.,2016; MENG et al., 2018; RAJARAM et al., 2019; SU et al., 2019; WAN et al.,2016)

1.4 Terapia celular com células-tronco

Na era da medicina regenerativa, a terapia com células tronco (CT) vem sendo muito utilizada como recurso terapêutico para regenerar órgãos e tecidos lesionados em várias doenças; além do uso em crescente expansão na bioengenharia com a criação de órgãos e tecidos artificiais. As CT são células indiferenciadas com capacidade proliferativa ilimitada e caracterizadas por sua habilidade de auto renovação e diferenciação em diversos tipos celulares (BEHR et al., 2010; DUSCHER et al., 2016; MATAI et al., 2020; PINHEIRO et al., 2019).

O potencial terapêutico das CT reside na sua capacidade de secretar citocinas, fatores de crescimento, enzimas, microvesículas / exossomos e material genético,

além de exibirem propriedades imunomodulatórias, que ajudam no reparo e regeneração de tecidos lesados. As CT podem ser classificadas quanto à sua plasticidade e origem. Em relação à plasticidade podem ser totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes e em relação à origem podem ser embrionárias ou adultas (Figura 8) (DUSCHER et al., 2016; ELLISON-HUGHES & MADEDDU, 2017; MIRZAEI et al., 2018).



Figura 8 - Classificação das células-troncos quanto à plasticidade e origem

Legenda: Quanto à plasticidade são classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotente e quanto a origem em embrionárias e adultas. (MCI): massa celular interna. (iPSC): Células-tronco de pluripotência induzida. Fonte:Adaptado de THONG et al., 2019.

São classificadas com CT totipotentes, as células capazes de originar todos os tipos celulares embrionários e extraembrionários, correspondendo à célula-ovo (zigoto) e às resultantes das primeiras clivagens. As CT pluripotentes são células derivadas da massa celular interna do blastocisto, que são capazes de gerar todos os tecidos derivados dos três folhetos embrionários do organismo: endoderma,
ectoderma e mesoderma. AS CT multipotentes possuem capacidade de diferenciação limitada a uma camada germinativa. Já as CT unipotentes apesar de potencial de diferenciação limitado, restrito a um único tipo celular, são candidatas ao tratamento de várias doenças (ALISON & ISLAM, 2009; RAJABZADEH *et al.*, 2019; ZAKRZEWSKI *et al.*,2019).

É possível induzir células diferenciadas a se tornarem pluripotentes novamente por meio de manipulações genéticas, sendo estas denominadas de células-tronco de pluripotência induzida (*iPSC*), que podem dar origem a todos os tipos celulares de um organismo. Takahashi e Yamanaka (2016) realizaram experimentos pioneiros, onde demostraram que fibroblastos de camundongo poderiam se desdiferenciar por transferência nuclear, fusão celular ou manipulação genética. A reprogramação celular para obtenção das *iPSC* permitiu uma melhor compreensão sobre os pontoschave epigenéticos de pluripotência e carcinogênese (RAJABZADEH et al., 2019; TAKAHASHI & YAMANAKA; 2013; ZAKRZEWSKI et al.,2019).

As CT podem ser classificadas quanto à origem em embrionárias e adultas as CT embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto que podem proliferar-se indefinidamente preservando sua pluripotência, mesmo *in vitro*. Dessa forma, estas células apresentam-se como as mais promissoras para a medicina regenerativa, estimulando a bioengenharia tecidual. Entretanto, por várias questões, principalmente éticas, o seu uso é restrito. A aplicabilidade clínica oferece riscos, uma vez que podem levar à formação de tumores (teratoma) e à rejeição imunológica (DAMDIMOPOULOU et al., 2016; ROMITO & COBELLIS; 2016; TORRES CRIGNA et al., 2018).

As CT adultas ou células-tronco residentes são células indiferenciadas localizadas em nichos num órgão ou organismo, são responsáveis por manter as necessidades fisiológicas de homeostase e variações orgânicas no crescimento, maturação, reprodução e senescência. Essas CT possuem a capacidade de se auto renovar e se diferenciar em limitados tipos celulares. Acredita-se que a sua principal função seja substituir, seguindo os limites de regeneração de cada tecido, as células especializadas mortas por envelhecimento, lesão ou doença. Estão distribuídas pelo organismo adulto em vários tecidos e órgãos como: Intestino, pele, músculos, cérebro. coração, sangue periférico, rim, vasos sanguíneos, polpa dentária, fígado, epitélio do ovário e testículos, medula óssea e tecido adiposo (Figura 9). São frequentemente multipotentes e sua linhagem leva a progenitores unipotentes para células

diferenciadas terminais. As células-tronco hematopoiéticas (CTH) e mesenquimais (CTM) são amplamente estudadas e utilizadas na prática clínica e na pesquisa básica, por serem retiradas com certa facilidade do tecido adulto de um doador (GURUSAMY et al.,2018; STONESIFER et al., 2017; TWEEDELL, 2017).





Legenda: As células-tronco adultas podem ser obtidas de diferentes fontes como: músculo, pele, ossos longos, costela e esterno, coração, tecido adiposo, cérebro, rins, polpa dentária, intestino e fígado. Após colheita do tecido é realizado o isolamento das células-tronco para expansão e diferenciação celular para uso futuro das células em terapia.

Fonte: Adaptado de UDE et al., 2018.

1.5 Células-tronco de tecido adiposo

O tecido adiposo (TA) é responsável pela reserva energética e homeostase térmica do individuo; oferece proteção mecânica contra choques e traumatismos externos e estática visceral. Possui importante função endócrina atuando na secreção de adipocinas, citocinas, quimiocinas e hormônios que regulam uma variedade de processos metabólicos e fisiológicos. O TA é classificado em branco e marrom. Em mamíferos, o tecido adiposo predominante é o branco, já o tecido adiposo marrom está presente em recém-nascidos, e praticamente ausente em adultos. O tecido adiposo branco está distribuído em depósitos de gordura: visceral (tecido próximo ou mesmo no interior das vísceras da cavidade abdominal), subcutânea (abaixo da pele nas regiões abdominal, glútea e femural) e intramuscular. Existem ainda diferenças quanto à funcionalidade e o metabolismo que variam de região para região de maneira que o TA apresenta ligação direta com patologias associadas à obesidade, como a resistência à insulina e a síndrome metabólica. O tecido adiposo é formado por células especializadas no armazenamento de lipídios, os adipócitos, que se encontram inseridos numa matriz de tecido conjuntivo frouxo que abriga também pré-adipocitos, células-tronco multipotentes, células endoteliais, pericitos, macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e células progenitoras hematopoéticas (Figura 10) (BAJEK et al.,2016; BAPTISTA et al., 2015; CIUFFI et al., 2017; ZUTTION et al., 2013).



Figura 10 - Composição celular do tecido adiposo

Legenda: Composição do tecido adiposo. Fonte: Adaptado de

http://www.jlimblengthrecon.org/viewimage.asp?img=JLimbLengthenReconstr_2017_3_1_4_202207_f2.jp g Acesso em 10 de jan. de 2020.

As células-tronco de tecido adiposo (CTA), foram isoladas de humanos pela primeira vez em 2001 e compõem um dos diversos tipos de células-tronco mesenquimais (CTM) presentes no organismo. Sua fácil obtenção associada ao alto rendimento, tornaram essas células muito atraentes para o uso na medicina regenerativa. O isolamento das CTA pode ser realizado através de lipoaspirados obtidos de doadores ou do próprio paciente. Em 1g de tecido adiposo o número de CTA obtidas varia entre 0,5 X 10⁴ e 2 X 10⁵ esse alto rendimento exclui a necessidade de manutenção da cultura *in vitro* a longo prazo, o que reduz os riscos de anormalidades cromossômicas. Tais propriedades ascenderam as CTA nos últimos 5 anos como excelente alternativa ao uso das células-tronco obtidas de medula óssea (BAJEK et al., 2016; KIM & JEONG, 2014; KOCAN et al., 2017; SHEYKHHASAN, et al., 2019; ZUK et al., 2001).

Uma vez que as CTA são células mesenquimais, elas apresentam características comuns as CTM atendendo aos critérios impostos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular tais como : aderência ao plástico *in vitro*, expressão positiva para os marcadores de superfície: CD105, CD73 e CD90 e ausência dos marcadores de superfície: CD45, CD34, CD11b, CD14, CD79a. CD19 e HLA-DR, além de possuir a capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblasto, condrócitos e adipócitos. Não existe um marcador especifico de CTA, porém trabalhos anteriores indicam que CTA humana são CD34 positivas e CD31 negativas, porém o marcador CD34 é perdido ao longo do cultivo celular e ainda apresentam a expressão dos seguintes marcadores: CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49b, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD106, CD146 e CD166 além dos demais já citados. Sabe-se que o perfil de marcadores varia entre as espécies e de acordo com o procedimento de isolamento e cultivo celular (MIRZAEI et al., 2018; SCHERBERICH et al., 2013; SOBHANI et al., 2017; ZHUANG et al., 2019).

As CTA secretam fatores bioativos que estimulam a proliferação celular, diferenciação, e a migração de vários tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, além de possuírem a capacidade de fornecer fatores protetores que podem reduzir a apoptose, fibrose, inflamação e estresse oxidativo. É o tipo celular mais indicado para promover a angiogênese, pois expressam níveis mais altos de fatores parácrinos angiogênicos, secretam também fatores que podem suprimir o sistema imunológico, fatores anti-inflamatórios, fatores de crescimento e uma variedade de citocinas e quimiocinas entre outras. Sabe-se que o perfil de secreção

de citocinas varia de acordo com o local do qual as células são obtidas (Figura 11). Diante de tais propriedades, essas células têm sido utilizadas terapeuticamente em: lesões como feridas, doenças respiratórias, doenças dos ossos e cartilagens, doença de Crohn, doença neurológica, doença renal, doenças cardíacas, disfunções urológicas e cirurgia plástica. (BAJEK et al.,2016; KOCAN et al., 2017; KOKAI et al., 2014; LI & HUA et al., 2017; SHEYKHHASAN, et al., 2019).



Figura 11 - Fatores tróficos liberados pelas células-tronco de tecido adiposo

Legenda: São fatores tróficos liberados pelas CTA: quimiocinas, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, fatores pró-angiogênico, anti-apoptótico e cicatrizantes.

Fonte: Adaptado de KOCAN et al., 2017.

Mesmo com todas as vantagens atribuídas às CTA, alguns problemas precisam ser superados para que seu uso na clínica seja intensificado. Entre eles está a padronização do protocolo de isolamento, uma vez que a viabilidade, rendimento e crescimento das células são afetados pelo tipo de procedimento de coleta. As CTA são influenciadas por fatores externos que podem ocorrer tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Células obtidas de indivíduos obesos possuem fenótipo alterado devido à exposição ao microambiente do tecido adiposo subcutâneo inflamado, assim como doenças crônicas como o diabetes podem interferir na função das células. Diferentes métodos de cultivo podem alterar o fenótipo das células. Além disso, o número de células necessário para tratamento em humanos assim como as vias de administração e frequência da administração precisam ser padronizados (BAPTISTA et al., 2015; HASSANSHAHI et al., 2019; KOCAN et al., 2017).

1.6 Células-tronco de tecido adiposo e reparo renal

A progressão tanto da doença renal aguda quanto da doença renal crônica resultam, inevitavelmente, na morte celular e acúmulo de matriz extracelular que constitui a fibrose renal, muito característica na doença renal terminal. Houve um progresso significativo no uso de células-tronco mesenquimais para impedir danos renais e muitos estudos têm utilizado as CTA, em virtude das propriedades compartilhadas entre as CTM como a capacidade de promover a regeneração e remodelação tecidual, que podem impedir o agravamento da doença renal por meio do bloqueio ou reversão do processo de fibrose renal, diminuir danos por estresse oxidativo, bloquear a apoptose, além de exercer a imunomodulação e imossupressão, favorecer a angiogênese e estímulo à diferenciação e proliferação das células progenitoras renais. (Figura12) (MARCHEQUE et al., 2019; PEIRED et al., 2016; WANG & SUN, 2018).



Figura 12 - Propriedades das células-tronco mesenquimais em doenças renais

Legenda: As células secretam fatores solúveis ou microvesículas que podem exercer uma série de ações regenerativas através de mecanismos parácrinos que induzem a proliferação e diferenciação de células residentes, angiogênese, imunossupressão e imunomodulação. Impedem a apotose, fibrose e estresse oxidativo Fonte: Adaptado de PEIRED et al., 2016.

Os estudos terapêuticos pré-clínicos aplicam-se na lesão renal isquêmica aguda, transplante renal, lúpus e nefropatia diabética, porém os testes em modelos de lesão renal aguda apresentam resultados mais promissores. Seu uso no apoio ao transplante renal tem crescido uma vez que secretomas liberados pelas células atuam impedindo a rejeição do rim transplantado. Efeitos adversos foram relatados após administração intravenosa de doses extremamente altas, em paciente crônico, que apresentava intensa deterioração renal (KIM et al., 2017). Dados na literatura mostram que a infusão das CTA sistêmica foi viável, segura e com redução de proteinúria (um marcador de progressão do dano renal) em 83% dos pacientes estudados (BOCHON et al., 2019; MARCHEQUE et al., 2019; SHEASHAA et al., 2016; SONG et al., 2017; VILLANUEVA et al., 2019). Resultados favoráveis foram observados ainda em trabalho que usou vesículas extracelulares em rim de porcos com estenose, cujos resultados

mostraram que as vesículas atenuaram a inflamação, com melhora da oxigenação na medula e córtex, assim como da função renal e fibrose, além de aumentarem o número de macrófagos e expressão de IL-10, sugerindo que as propriedades antiinflamatórias se mantem mesmo sem o uso direto das células (EIRIN et al., 2017).

Atualmente, seis ensaios clínicos ativos estão registrados no Clinical Trials *online*¹ utilizando as CTA na doença renal. A pesquisa clínica encontra-se focada na doença renal crônica, nefropatia diabética e estenose da artéria renal com hipertensão renovascular. A maioria dos estudos estão nas fases 1 e 2 e se concentram nos Estados Unidos. Pode-se observar um forte direcionamento da pesquisa no uso de CTA associado a diversas drogas. Uma pesquisa avalia o uso autólogo das CTA em altas e baixas doses, sendo essa uma investigação muito importante, uma vez que o desconhecimento da dosagem ideal é um grande empecilho para o seu uso na clínica (QUADRO1).

Registro	Condições	Intervenções	Fase	data	Localização
NCT03939741	Doenças renais crônica	Fração vascular estromal (não expandida)	1 e 2	07/05/19	Bangladesh
NCT02933827	Doença renal crônica (moderada e severa)	Droga: Elixcyte	1 e 2	14/10/16	Taiwan
NCT02808208	Doença renal terminal – complicação vascular	Célula-tronco mesequimal derivada do tecido adiposo	1	21/06/16	Estados Unidos
NCT03840343	Doença renal crônica- Nefropatias, diabetes 1 e 2, nefropatia diabética	Célula mesequimal autologa de tecido adiposo em altas e baixas doses	1	15/02/19	Estados Unidos
NCT03325322	Doença renal crônica, diabetes melitus, nefropatia diabética.	Suplemento dietético: Fisetina	2	30/10/17	Estados Unidos
NCT02266394	Estenose da artéria renal, nefropatia isquêmica, doença renovascular, doença renal crônica	Entrega de células- tronco mesenquimais com colocação de Stent.	1	17/10/14	Estados Unidos

Quadro 1 - Ensaios clínicos	que utilizam CTA no	tratamento da doença renal
-----------------------------	---------------------	----------------------------

Fonte: Clinical Trial <https://clinicaltrials.gov/.>. Acesso em 13 de dez de 2019.

¹ Endereço eletrônico do Clinical Trials: <u>https://clinicaltrials.gov/</u>. Acesso em 13 de dez de 2019.

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos *on-line*², entre janeiro e setembro de 2019, havia 23.630 pessoas à espera do transplante renal, destas apenas 4.617 conseguiram realizar o transplante. A carência de órgãos, dentre outros fatores, limita esse tratamento e leva à necessidade iminente do uso de novas terapias eficazes para curar ou retardar a progressão das doenças renais. Na atualidade, a terapia celular com células-tronco mesenquimais se apresenta como uma estratégia terapêutica promissora para várias doenças, entre elas as renais. Nos últimos 5 anos, o uso de células-tronco de tecido adiposo tem se consolidado como o tipo celular mais promissor, devido às suas propriedades intrínsecas, em estudos clínicos como terapia celular para diferentes patologias (SHEYKHHASAN, et al., 2019). Portanto, o presente projeto se propõe a avaliar a organização estrutural e ultraestrutural do parênquima renal, além do status oxidativo de rins de ratos com nefropatia isquêmica após tratamento com células-tronco de tecido adiposo.

² Endereço eletrônico com as estatísticas referentes ao transplante de órgãos no Brasil: <u>http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=552&c=1039&s=0&friendly=estatisticas</u>. Acesso em 10 de dez de 2019.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a morfologia e o status oxidativo em rins de ratos com nefropatia isquêmica após injeção subcapsular de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo subcutâneo e comparar as repostas nos diferentes tempos experimentais de seis e oito semanas.

3.2 Específicos

a) Isolar e expandir as CTA in vitro;

b) Certificar a natureza mesenquimal das CTA após expansão in vitro;

c) Validar o modelo 2R1C com o monitoramento da pressão arterial ao longo de todo o experimento.

Após o tratamento com as CTA:

a) Analisar o volume urinário e parâmetros bioquímicos da urina e do plasma sanguíneo dos animais 15 e 30 dias após o tratamento;

b) Localizar as CTA nos rins 15 e 30 dias após o tratamento;

c) Descrever a organização estrutural e ultraestrutural dos rins 15 e 30 dias após o tratamento;

d) Identificar o status oxidativo nos rins 15 e 30 dias após tratamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 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 (nº CEUA/010/2017). Todos os procedimentos seguiram a regulamentação existente sobre experimentação com animais (MARQUES et al., 2009). Neste trabalho, foram utilizados ratos *Wista*r machos e ratos *Lewis*, que são animais transgênicos que expressam a proteína verde fluorescente GFP em todas as suas células, incluindo tecido adiposo (LEW-Tg eGFP F455/Rrrc). Este último, doado gentilmente pelo professor Dr Alfredo Miranda Góes do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia (IBRAG/UERJ) em ambiente com temperatura ($21 \pm 2^{\circ}$ C) e umidade ($60 \pm 10\%$) controladas, submetidos a ciclo de luz invertido (12h/claro/escuro) e exaustão 15 min/h. Foram alimentados com ração balanceada padrão (NUVILAB®, Brasil) e água *ad libitum*.

4.2 Isolamento e manutenção das CTA

As células-tronco mesenquimais de tecido adiposo subcutâneo da região inguinal foram obtidas de ratos *Wistar* e *Lewis* (animais GFP⁺), com 3 meses de idade, pesando cerca de 300g, após serem eutanasiados em câmara de CO₂ de acordo com o protocolo (MELO et al., 2015). No fluxo laminar, com o auxílio de uma pinça e uma tesoura estéreis, foram extraídas da região subcutânea o tecido adiposo (TA). O TA foi transferido para uma placa de Petri contendo 2 mL de DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco, Sigma–Aldrich, pH 7.2) sem soro, com a finalidade de facilitar a fragmentação do tecido

Após fragmentação o TA foi transferido para um tubo Falcon contendo colagenase tipo II 0,2% - (Sigma–Aldrich) em volume correspondente ao dobro do

volume obtido após a fragmentação. Com isso, o TA foi incubado com colagenase sob agitação lenta, a uma temperatura de 37°C por 50 minutos. Após o tempo de incubação o TA foi filtrado em *Cell Strainner* de 100 µm de abertura do poro .O conteúdo com as células-tronco adiposas foi recolhido e a enzima neutralizada com meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab) + antibióticos (1% penicilina, 1% Garamicina, 1% estreptomicina - Sigma-Aldrich) e antifúngico (1% anfotericina B - Sigma-Aldrich). O conteúdo então foi centrifugado a 1500rpm por 8 minutos à 4°C, o sobrenadante desprezado e o *Pellet* contendo as células foi ressuspendido em 5 mL de meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) + antibióticos (1% penicilina, 1% Garamicina, 1% estreptomicina -Sigma-Aldrich) e antifúngico (1% anfotericina B - Sigma-Aldrich). As células foram plaqueadas em frascos de cultivo de 25 cm² e mantidas em estufa a 37° C em atmosfera úmida de 5% de CO₂ (Figura 13).



Figura 13 - Isolamento das células-troncos do tecido adiposo

Legenda: (A) fragmentação do tecido adiposo; (B) incubação do tecido adiposo com colagenase; (C) no conteúdo celular foi adicionado DMEM para neutralização da colagenase; (D) após centrifugação o pellet celular foi ressuspendido em DMEM suplementado a 20% com SFB; (E) células foram plaqueadas em frasco de cultivo.
Fonte: A autora, 2020.

O meio de cultivo foi trocado 24 horas após o plaqueamento para a remoção de células não aderente e excesso de gordura. Para manutenção da cultura o meio foi trocado 2 vezes/semana, e quando as células atingiram 80% de confluência foram dissociadas dos frascos por tripsinização através da adição de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich), procedimento caracterizado como primeira passagem (P1). As células foram centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos à 4°C, o sobrenadante descartado, o *pellet* celular foi ressuspendido em 10ml de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e o volume foi transferido para dois novos frascos de cultivo, essa metodologia se repetiu por três vezes até as células chegarem à terceira passagem (P3) para obtenção da cultura de CTA (Figura 14).



Figura 14 - Subcultivo das células mesenquimais adiposas

Legenda: No momento do isolamento as CTA se encontram no momento (P0),após uma semana as células passam por dissociação enzimática e são divididas em 2 frascos para expansão das células (P1).O evento se repete nas semanas seguintes até se obter as células na fase (P2) e (P3). Fonte: A autora, 2020.

4.3 Caracterização morfológica das CTA

As CTA em P1, P2 e P3 foram plaqueadas a uma densidade de 10⁴ células em placas de 24 poços contendo lamínulas, e cultivadas com DMEM suplementado a 10% com SFB a 37 °C em uma atmosfera úmida de 5% de CO₂ por 24 horas. As células nas diferentes passagens foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 10 minutos e, em seguida, foram coradas em hematoxilina por 40 segundos, lavadas em água

destilada, coradas em eosina por 20 segundos, lavadas em água destilada, desidratadas em álcool 70%, 90% e 100% por 3 segundos e clarificadas em Xilol I e II por 3 segundos. As lamínulas foram montadas em Lâminas contendo entellan (Merck). As imagens foram capturadaspela câmera Olympus DP72 acoplada ao microscópio Olympus BX53.

4.4 Caracterização imunofenotípica das CTA por citometria de fluxo

Para caracterização imunofenotípica, as CTA na terceira passagem (P3) foram removidas do frasco de cultura, após atingirem 80% de confluência, por adição de accutase (Sigma-Aldrich) por 2 minutos, a 37°C. A seguir, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o *Pellet* ressuspendido em 1 ml de PBS gelado. Em seguida, foi realizada a contagem das células para se obter o volume de suspensão na qual contivesse 10⁵ células. O volume calculado foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o *Pellet* ressuspendido em 20µl de PBS gelado. As amostras de 10⁵ células foram incubadas com anticorpo anti-CD105 conjugado ao fluorocromo PE (BD Biosciences) e anti-CD45 conjugado ao fluorocromo PE (BD Biosciences) e anti-CD45 conjugado ao fluorocromo FITC (BD Biosciences), na diluição de 1:10 por 30 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após marcação, as células foram centrifugadas a 1200rpm por 5 minutos e resuspendidas em 500µl de PBS gelado antes da análise de fluorescência no citômetro de fluxo (BD Accuri, BD Biosciences). As análises dos dados foram realizadas utilizando o BD CSampler software.

4.5 Ensaio de diferenciação

Na terceira passagem, as CTA foram submetidas a ensaios de diferenciação para a linhagem adipogênica e osteogênica de acordo com protocolo previamente descrito (NEUHUBER et al., 2008). As células foram plaqueadas a uma densidade de 10⁵ células em placas de 6 poços e cultivadas com DMEM suplementado a 10% de SFB a 37°C em uma atmosfera úmida (5% de CO₂) até atingir uma confluência de

80% para dar início ao protocolo de diferenciação. Para indução adipogênica, as células foram cultivadas em meio de manutenção constituído por DMEM com 10% SFB 1% penicilina/ estreptomicina/ garamicina, 2,5µg/ml de insulina humana, 100nM dexametasona; e meio de indução, o qual acrescentava 100 µM de indometacina e 5 µM de rosiglitazona (todos reagentes Sigma-Aldrich). Foram realizados 3 ciclos, que consistiam em manter as células por 3 dias com meio de indução e substituir pelo de manutenção por apenas 24 horas. Em seguida, as células foram mantidas no meio de indução por mais 3 dias, fechando 1 ciclo. Após o terceiro ciclo (21 dias), as células foram mantidas no meio de manutenção e a análise de diferenciação realizada. No procedimento de coloração, as células foram lavadas em PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o paraformaldeído foi removido e as células lavadas em água destilada, após retirar a água as células foram incubadas com isopropanol 60% por 2 min. Na sequência, foram coradas pelo do Oil Red 0,5% por 30 minutos, após as células foram lavadas em água destilada e incubadas por hematoxilina por 1 minuto, o excesso de corante foi removido com água destilada e as lâminas montadas com glicerol. Os vacúolos de gordura foram evidenciados e as imagens foram obtidas através da captura pela câmera Olympus DP72 acoplada ao microscópio Olympus BX53.

Para indução osteogênica, as células foram cultivadas em meio de indução adipogênica com troca a cada 3/4 dias. O meio de indução era constituído por DMEM com 10% SFB 1% penicilina/ estreptomicina/ garamicina, β-glicerofosfato145mM, ácido L-ascórbico 2 10mM e dexametasona 1mM (todos reagentes Sigma-Aldrich). Foram realizados 3 ciclos Após o terceiro ciclo (21 dias) foi realizado o procedimento de coloração, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, o paraformaldeído foi removido e as células lavadas em água destilada e coradas pela Alizarina Red por 5 minutos, após remoção do corante por lavagem com água destilada foi possível observar a matriz extracelular rica em cálcio as imagens foram capturadas pela câmera Olympus DP72 acoplada ao microscópio Olympus BX53.

4.6 Identificação das CTA por imunofluorescência

Para identificação das CTA por imunofluorescência, 10⁴ células P3 foram cultivadas em placa de 24 poços contendo lamínulas e mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB – Cultilab + antibiótico (1% penicilina, 1% Garamicina, 1% estreptomicina - Sigma-Aldrich) e antifúngico (1% anfotericina B - Sigma-Aldrich) a 37°C e 5% de CO₂ até atingir 80% de confluência. Inicialmente, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos e lavadas 3 vezes com PBS e BSA 1%. Em seguida, as ligações inespecíficas foram bloqueadas com PBS/BSA 3% por 30 minutos e as células incubadas com dois anticorpos para marcadores de células mesenquimais: anti-CD105 conjugado ao fluorocromo PE (BD Biosciences) e anti-CD90 (BD Biosciences) (primário), na diluição 1:50, por 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo secundário utilizado foi o Alexa 488 conjugado com FITC (Invitrogen) na diluição de 1:50 por 1 hora a temperatura ambiente. O núcleo das células foi marcado com DAPI (4'-6-Diamidino-2- phenylindole), na diluição 1:10.000, por 5 minutos. Após a lavagem com PBS, as lâminas foram montadas com Prolong (Life technology) e visualizadas ao microscópio confocal de varredura a laser LSM 510 META (Zeiss). Para identificação das células CTA GFP+ (obtidas de ratos Lewis) foi realizado o protocolo descrito acima, para marcação com CD105.

4.7 Grupos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar com três meses de idade pesando em média 350g com n=6-10 por grupo. Os grupos experimentais foram divididos em dois. grupos experimentais de seis e oito semanas. O grupo experimental seis semanas é composto por: animais controle SHAM 45d – submetidos ao estresse cirúrgico; animais clipados 2R1C 45d – submetidos a clipagem da artéria renal esquerda; animais tratados 2R1C + CTA 15d – submetidos a clipagem da artéria renal e tratados com as CTA e eutanasiados 15 dias após o tratamento (Figura 15A). O grupo experimental oito semanas é composto por: animais controle SHAM 60d – submetidos ao estresse cirúrgico; animais cirán esquerda 2R1C + CTA 15d – submetidos a clipagem da artéria renal e tratados com as CTA e eutanasiados 15 dias após o tratamento (Figura 15A). O grupo experimental oito semanas é composto por: animais controle SHAM 60d – submetidos ao estresse cirúrgico; animais clipados 2R1C 60d – submetidos a clipagem da artéria

renal esquerda; animais tratados 2R1C + CTA 30d – submetidos a clipagem da artéria renal esquerda e tratados com as CTA e eutanasiados 30 dias após o tratamento. (Figura 15B).



Legenda: (A) Grupo experimental dos animais eutanasiados na sexta semana de experimento. SHAM 45d – animais submetidos ao estresse cirúrgico, sem adição do clip; 2R1C 45d - animais submetidos a clipagem renal; 2R1C + CTA 15d – animais clipados e submetidos a injeção de CTA na quarta semana; (B) Grupo experimental dos animais eutanasiados na oitava semanas de experimento. SHAM 60d – animais submetidos ao estresse cirúrgico, sem adição do clip; 2R1C 60d - animais submetidos a clipagem renal; 2R1C + CTA 30d – Animais clipados e submetidos a injeção de CTA na quarta semanas.

Fonte: A autora, 2020.

4.8 Indução da nefropatia isquêmica

Neste trabalho foi utilizado o modelo proposto por Goldblatt – 2R1C (GOLDBLATT et al., 1934), os ratos foram anestesiados com Xilazina (Anasedan - 20 mg/kg) e Cetamina (Virbac - 40 mg/Kg), intraperitonealmente. A seguir, uma incisão cirúrgica foi realizada para localização e isolamento da artéria renal esquerda, a qual foi cuidadosamente isolada. O rim direito permabeceu intocado. Uma vez isolada, esta artéria foi parcialmente ocluída pela colocação de um clipe de prata (0,2 mm de abertura) (Figura 16). Esta oclusão reduziu o fluxo renal em cerca de 50% (PEREIRA et al., 2019; LUPU et al., 1972) e promoveu uma condição necessária para desenvolver a nefropatia isquêmica. Ratos submetidos ao mesmo procedimento

cirúrgico, porém sem oclusão parcial da artéria renal com o clip de prata, foram considerados como animais controles (SHAM).



Figura 16 - Cirurgia para indução da nefropatia isquêmica no rim esquerdo

Legenda: (A) Dimensão do clipe de prata (0,2 mm de abertura); (B) Clipe implantado na artéria renal esquerda. Fonte: LIRA, 2017.

4.9 Injeção de CTA na região subcapsular do rim

Na terceira passagem, as CTA foram incubadas com a accutase (Sigma-Aldrich) por 2 minutos, a 37°C, e removidas dos frascos 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. As seringas de 1 mL foram preparadas com 10⁶ células diluídas em 0,3 mL de PBS gelado. Por fim, os animais do grupo 2R1C+CTA foram anestesiados como descrito anteriormente e as células foram injetadas na região subcapsular do rim esquerdo (Figura 17).



Figura 17 – Injeção das CTA na região subcapsular do rim

Legenda: Animais 2R1C+CTA recebem a injeção de CTA na região subcapsular do rim esquerdo. É possível se observar a formação de uma bolha referente às células que serão absorvidas pelo parênquima renal. Fonte: LIRA, 2017.

4.10 Monitoramento da pressão arterial

A aferição da pressão arterial sistólica (mmHg) foi realizada por um método não invasivo de pletismografia de cauda (Letica LE 5100 – Pantalab ®, Espanha). Nesse método, a artéria da cauda foi brevemente ocluída com o auxílio de um pequeno "cuff", além de um sensor que também é colocado na cauda do animal. Esse sensor detectou a pulsação arterial e enviou o sinal para um conversor analógico digital. A aferição da pressão arterial foi realizada semanalmente, iniciando na semana anterior ao procedimento da clipagem da artéria renal até a semana 6 para os grupos analisados após 45 dias e 8 semanas para os grupos analisados após 60 dias, momento no qual foram eutanasiados. Foram obtidas cinco medições repetidas para cada animal dos diferentes grupos experimentais, em cada sessão, gerando uma média no final. Os animais foram adaptados previamente por duas semanas, antes do período experimental, para minimizar a influência do estresse induzido pela manipulação do animal durante a aferição da pressão arterial.

4.11 Análise bioquímica

Na semana 6, os animais dos grupos SHAM 45d, 2R1C 45 e 2R1C+CTA 15d e na semana 8, os animais dos grupos SHAM 60d, 2R1C 60 e 2R1C+CTA 30d foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas para a coleta da urina por um período de 24 horas, com livre acesso à água e comida (Figura 18). Após coleta, a urina foi centrifugada a 1500 rpm, por 10 minutos, e congelada a -20°C para posterior análise. Neste mesmo dia, os animais foram anestesiados com Xilazina (20 mg/kg) e Cetamina (40 mg/Kg), com injeção intraperitoneal. Amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca e colocadas em tubos Falcon de 15 ml com heparina. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm, por dez minutos, à temperatura ambiente, e o plasma foi armazenado a -20°C para análise bioquímica. Para avaliar a função renal, analisamos os níveis de creatinina, ureia e proteínas totais do plasma sanguíneo.



Figura 18 - Gaiola metabólica

Legenda: A gaiola metabólica permite que o animal tenha livre acesso à água e comida. Fonte:https://www.analiticaweb.com.br/p.php?Bid=p 53e8d19104236. Acesso em 20 de jan. de 2020.

4.11.1 Volume urinário e uroanálise

O volume urinário total em 24 horas, foi coletado e realizada a uroanálise com auxílio das tiras reagentes (iChem 10 sg urine chemistry strips - Iris diagnostics), considerado o modo mais simples e rápido para realizar 10 ou mais análises bioquímicas clinicamente importantes, além de detectar a presença de sangue na urina. As tiras reagentes possuem pequenas almofadas absorventes, impregnados com substâncias químicas, presas a uma tira de plástico (Figura 19). A reação química produz determinada coloração que ocorre quando a almofada absorvente entra em contato com a urina. As cores resultantes foram interpretadas, comparando-as com uma tabela de cores fornecidas pelo fabricante (Iris diagnostics). Inicialmente, a amostra foi homogeneizada, em seguida, colocada em contato com a tira reagente por aproximadamente 60 segundos. Logo após, foi removido o excesso com auxílio de papel absorvente e a leitura da tira foi realizada. Este teste semi-quantitativo foi capaz de analisar parâmetros bioquímicos como: bilirrubina, urobilinogênio, corpos cetônicos, ácido ascórbico, glicose, proteínas, sangue e nitrito, além de detectar a presença de leucócitos, medir pH e densidade urinária. Todos os resultados de cada amostra foram anotados em tabela comparativa entre os grupos experimentais.

Legenda:Cada área representada na fita está relacionada a uma análise bioquímica específica. Fonte: A autora, 2020.

4.11.2 Quantificação da creatinina do plasma

As concentrações plasmáticas de creatinina dos diferentes grupos experimentais foram analisadas com uso do kit comercial da Bioclin (Creatinina cinética - K067) para leitura no espectrofotômetro (GENESYS 10S UV-Vis – Thermo Scientific) em 510nm, aos 30 e 90 segundos. A técnica foi baseada na reação da creatinina com o picrato alcalino em meio tamponado, obtendo-se 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 plasmática de acordo com a fórmula a seguir:

 Δ A do padrão = Abs. 90 segundos – Abs. 30 segundos Creatinina (mg/dL) = Δ A da amostra x concentração do padrão (3mg/dL) Δ A do padrão

Os valores obtidos foram utilizados na construção dos gráficos de concentração dos gráficos de concentração da creatinina utilizando o Software Graph Pad Prism 8 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA).

Figura 19 - Tiras reagentes utilizadas na análise bioquímica



As concentrações plasmáticas da ureia foram dosadas através do kit comercial da Bioclin (Ureia cinética – K056) para leitura no espectrofotômetro (GENESYS 10S UV-Vis – Thermo Scientific) em 340 nm aos 30 e 90 segundos. A técnica da quantificação da ureia está baseada na oxidação de NADH a NAD+. Durante a reação, portanto, 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 a seguir:

 Δ A do padrão ou da amostra = ABs. 90 segundos – ABS. 30 segundos Ureia (mg/dL) = $\underline{\Delta}$ A da amostra X 70 Δ A do padrão

Os valores obtidos foram usados na construção dos gráficos de concentração da ureia utilizando o software Graph Pad Prism.

4.11.4 Quantificação das proteínas totais do plasma

As concentrações das proteínas totais no plasma foram realizadas com uso dos kits comerciais da Bioclin (Proteínas totais - K031) para leitura no espectrofotômetro (GENESYS 10S UV-Vis – Thermo Scientific) em 545nm e 600nm. A quantificação das proteínas totais no plasma foi realizada pelo método de biureto, onde as ligações peptídicas das proteínas reagem com os íons cúpricos, em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta que é proporcional ao teor das proteínas no meio. A partir dos valores de absorbância de cada amostra dos diferentes grupos experimentais, calculamos os valores das proteínas totais do plasma de acordo com a seguinte fórmula:

Proteínas Totais (g/dL) = <u>Abs. da amostra</u> X 4 Abs. do padrão Os valores obtidos foram utilizados na construção dos gráficos de concentração das proteínas totais do plasma, no software Graph Pad Prism 8 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA).

4.12 Análise do parênquima renal por microscopia de luz

Após a eutanásia dos animais nas semanas 6 e 8, os rins foram coletados, e preparados de acordo com o protocolo padrão, onde foram fixados em formol 10% por 72 horas, lavados em água corrente por 1h e desidratados em álcool 70% overnight. No dia seguinte, foi dado prosseguimento à desidratação em álcool 90% e duas séries em álcool 100% por 1h em cada banho. 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. As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinadas em três séries de xilol e hidratados em séries decrescentes de álcool (100%, 90%, 70%) por dois minutos em cada etapa. Os cortes foram lavados em água destilada e corados. O excesso de corante foi retirado em água destilada e em seguida os cortes foram desidratados em series crescentes de álcool (70%,90%, 100%) por dois minutos seguida de montagem das lâminas com Entellan (Merck).

4.12.1 Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

Para análise do parênquima renal, os cortes foram imersos em hematoxilina por 40 segundos em seguida na eosina por 20 segundos.

4.12.2 Coloração Ácido Periódico-Schiff

Para identificação de glicoproteínas no parênquima renal, os cortes foram imersos em ácido periódico por 15 minutos e corados com o reativo de Schiff por 30 minutos e, em seguida, foram contracorados em hematoxilina por 5 segundos.

4.12.3 Coloração Picro Sirius Red

Para análise da deposição de fibras colágenas no parênquima renal, os cortes foram imersos no Picro-Sirius Red (solução a 0,1% de sirius red F3BA - Sigma-Aldrich) por 1 hora e, em seguida, foram imersos em solução de HCI 0,1N

4.13 Análise quantitativa de colágeno

Para quantificação das fibras colágenas, foram utilizadas três lâminas coradas por Picro Sirius Red de cada animal, sendo capturados dez campos aleatórios de cada lâmina, totalizando 180 campos capturados por grupo experimental. As imagens foram obtidas através de câmera Olympus DP72 acoplada ao microscópio Olympus BX53. As fotomicrografias foram analisadas pelo programa Image-Pro Plus 7.0, onde as regiões coradas em vermelho foram quantificadas, uma vez que as fibras colágenas são coradas em vermelho pelo corante. Os valores médios das áreas selecionadas foram expressos como porcentagem de área marcada.

4.14 Localização das células CTA GFP+ no rim por imunoperoxidase

Para rastreamento das células nos rins tratados, foram utilizadas CTA GFP+, obtidas de ratos *Lewis* transgênicos para a proteína verde fluorescente em todas as

sua células, os cortes foram desparafinados através de dois banhos de xilol e hidratadas em séries decrescentes de álcool (100%, 90%, 70%) por dois minutos em cada etapa. Após lavagem com água destilada, os cortes foram incubados com 50 µl de peróxido de hidrogênio dez volumes por 15 minutos, com o objetivo de eliminar a peroxidase endógena. Em seguida, os cortes foram incubados em tampão citrato pH 6,0, por 20 minutos a 60°C, para a recuperação dos sítios antigênicos. Após três lavagens com PBS (pH 7,6), de 5 minutos cada, os cortes foram submetidos à solução de bloqueio (PBS/BSA 3%) por 20 minutos, com o objetivo de evitar a ligação inespecífica do anticorpo primário. Posteriormente, o tecido foi incubado com anticorpo primário policional anti-GFP (Ab-290 – Abcam) diluído (1:300) em PBS/BSA 1% overnight. No dia seguinte, o tecido foi lavado com PBS (pH 7,6) e incubado com anticorpo secundário biotinilado por 10 min (kit vectastain Ref: PK-7800) e, em seguida, o procedimento de lavagem foi repetido. A solução de estreptavidina (kit vectastain Ref: PK-7800) foi adicionada sobre o corte por 5 minutos. Na sequência, a estrepatvidina foi retirada e o corte incubado do DAB (vectastain Ref:SK-4100) por um minuto e, após, o corte foi lavado em água destilada por dois minutos e, em seguida, o tecido foi corado com hematoxilina por 40 segundos e lavado em água destilada por dois minutos e submetido à desidratação crescente em álcool (70%, 90%, 100%) por dois minutos cada. O tecido foi banhado por duas vezes em xilol por dois minutos cada e as lâminas foram montadas com entellan (Merck). As imagens foram capturadas pela câmera Olympus DP72 acoplada ao microscópio Olympus BX53.

4.15 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após a eutanásia dos animais, fragmentos de rins foram coletados e fixados em Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformoldeído 4% diluído em 0,1 M tampão cacodilato de sódio contendo 5 mM de cloreto de cálcio - pH 7,2) por 72 h a 4°C. Os fragmentos foram lavados três vezes em tampão Cacodilato (0,1M) por 15 minutos, em seguida foi realizada a etapa de pós-fixação com tetróxido de ósmio com ferrocianeto de potássio na concentração de (1:1) por 45 minutos, ao abrigo da luz. Em seguida, os fragmentos foram lavados três vezes em tampão cacodilato (0,1M) por 15 minutos cada. Após novas lavagens, o material foi desidratado em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%-2x), 30 minutos cada etapa. O material foi infiltrado em resina epóxi (PolyBed® 812 – Polysciences) diluído em acetona 100% na proporção (1:2) overnight ; (1:1) por 2h, (2:1) por 2h e, em seguida, o material foi colocado em resina por 24 horas na geladeira No dia seguinte foi realizado um novo banho de resina pura por 24h, sendo as seis horas finais na capela de exaustão e, posteriormente, o material foi incluído em resina pura por 48h a 60°C para polimerização. Cortes ultrafinos foram obtidos e recolhidos em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila e citrato chumbo para análise ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL- JEM-1011 da Plataforma Rudolf Barth de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz.

4.16 Análise do status e dano oxidativo por espectofotometria

Os rins esquerdos foram homogeneizados no aparelho turrax (Ika-Labortechnik) em tampão fosfato de sódio pH7,2 (0,1M) num volume 10X superior ao peso da amostra e em seguida foram centrifugados a 2000rpm por dez minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e congelado a –80°C. Com os homogenatos, foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes (catalase e glutationa peroxidase) e o marcador de dano oxidativo proteico (carbonilação de proteínas), os quais foram mensurados através de reações colorimétricas com leitura no espectrofotômetro. (GENESYS 10S UV-Vis – Thermo Scientific)

4.16.1 Mensuração da atividade da catalase

Foram utilizados 40µl de homogenato em cubetas de quartzo. Em cada cubeta foi adicionado 1ml de tampão com peróxido (25ml de tampão fosfato para 40µl de H₂O₂) gelado, seguida de leitura instantânea no comprimento de onda de 240nm, no espectrofotômetro (GENESYS 10S UV-Vis – Thermo Scientific) por 60 segundos, com intervalo de 30 segundos.

4.16.2 Mensuração da atividade da glutationa peroxidase

Foram utilizados 40µl do homogenato em cubetas contendo 1560µl de solução de uso (Tampão Fosfato -70ml, Glutationa Redutase – 14ml, Glutationa Reduzida-14ml, Azida Sódica – 3,5ml) em seguida as amostras foram incubadas por 10 minutos, com 40µl de NADPH + 40ul de H₂O₂ seguida de leitura instantânea no espectrofotômetro (GENESYS 10S UV-Vis – Thermo Scientific) no comprimento de onda de 340nm, por 5 minutos, com intervalos de 10 segundos.

4.16.3 Mensuração das proteínas carboniladas

Os homogenatos foram submetidos à quantificação de proteínas carboniladas pelo método de Wehr & Levine (2013). Primeiramente, 75µl de amostra foi lavada usando 500µl de ácido tricloroacético - TCA 10% e centrifugada a 5000g por 3 minutos, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados a esse precipitado 500µl de difenilhidrazina - DNPH em metade da amostra (A) e à outra metade da amostra (B) foram adicionadas 10mM e 500µl HCl a 2M e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Durante a incubação, as amostras foram vigorosamente misturadas a cada 5 minutos. Após incubação, 500µl de TCA 10% foram adicionados em todas as amostras e as proteínas foram precipitadas e centrifugadas a 5.000g por 3 minutos. Depois de descartar o sobrenadante, o precipitado foi lavado 3 vezes com uma mistura de etanol- acetato de etila (1:1), centrifugado a 5.000g por 3 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. O precipitado foi dissolvido em 200µl de guanidina (6M) e centrifugado a 5.000g por 3 minutos. O sobrenadante foi utilizado para leitura a 370 nm.

4.17 Mensuração de marcadores de dano oxidativo por western blotting

Para quantificação de marcadores de dano oxidativo (3-Nitrotirosina) e (4-HNE) através da técnica de western blotting, fragmentos dos rins esquerdos foram lisados em tampão de lise – RIPA, contendo 1% triton x-100, 50mM Tris (pH 7,4), 30mM pirofosfato de sódio, 150mM cloreto de sódio, 0,1% SDS, 50mM fluoreto de sódio, 1mM ortovanadato de sódio e 10µl/ml de coquetel inibidor de protease (sigma). Os fragmentos foram homogeneizados no aparelho turrax (Ika-Labortechnik) e, após centrifugação a 13.000 rpm por 25 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C até a sua utilização. As concentrações proteicas das amostras foram quantificadas através de kit específico (BCA Protein Assay Reagent, Thermo Scientific) com auxílio de leitor de Elisa (FLUOstar Omega - BMG LABTECH) no comprimento de onda de 562nm (TU-1800UV-VIS). Em seguida, as amostras foram aliquotadas e o tampão de amostra (Tris-HCI 50mM, pH 6,8. SDS 1%, 2mecaptoetanol 5%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,0001%) adicionado para desnaturar as proteínas a uma temperatura de 100°C por 5 minutos. As amostras foram mantidas a -20°C até a análise.Para análise, as proteínas totais foram separadas em gel de poliacrilamida a 12% stain-free (BioRad - 161-0185) por 60 minutos a 150V. Para a identificação dos respectivos pesos moleculares durante a separação das proteínas por eletroforese, utilizou-se marcador de peso molecular específico (GE Healthcare). Após a corrida, as proteínas foram transferidas utilizando o sistema semi-dry (Bio-RAD) a uma membrana de PVDF (GE Healthcare) por 45 minutos a 15V. Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 1:30h com solução Tween-TBS (Tris-HCl 20mM, pH7,5, NaCl 0,5mM, Tween-20 0,05%) contendo 5% de leite desnatado molico. Em seguida, a membrana foi incubada overnight com anticorpos primários monoclonais anti 3-Nitrotirosina (SC-32757 -1:500) e 4-HNE (MAB 3249 - 1:500) diluído em solução de bloqueio a 3%. No dia seguinte, a membrana foi incubada por 30 minutos no agitador. Após lavagem da membrana com T-TBS, foi adicionado o anticorpo secundário anti-mouse biotinilado (Invitrogem -1:5000), em ambas as marcações, diluído em T-TBS com leite 3% por 1h. As membranas foram novamente lavadas com T-TBS e incubadas com estreptavidina-peroxidase (Invitrogen - 1:5000), em T-TBS com leite 3% por 1h. Finalmente, as membranas foram lavadas e incubadas por um minuto com a solução quimioluminescente ECL Clarity (BioRad) e reveladas no ChemiDoc MP (BioRad). As amostras foram normalizadas pelas bandas presentes no gel stain-free. Para quantificação da densidade das bandas, utilizou-se o Photoshop CS5 Extended.

4.18 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio-padrão (SD). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) *oneway*, com exceção da pressão arterial que foi analisada por *two-way* (ANOVA) ambos seguidas de pós-teste de Holm-Sidak, utilizando o software Graph Pad Prism 8 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA), onde p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Morfologia das CTA

As células foram isoladas do tecido adiposo subcutâneo através da digestão enzimática com colagenase, após centrifugação foram plaqueadas e mantidas em cultura por três semanas. Após a primeira passagem (P1) podemos observar a presença de poucas células arredondadas (setas) e células fusiformes em maioria (Figura 20A). Em (P2) as células encontram-se na segunda semana de cultivo e a maioria das células apresentam morfologia fusiforme típica de células mesenquimais (Figura 20B), característica que se mantém na terceira passagem (P3) (Figura 20C).

Figura 20 - Morfologia da CTA em cultivo celular



Legenda: Coloração de Hematoxilina Eosina (A) CTA em P1, com presença de algumas células arredondadas (setas); (B) CTA em P2, cultura homogênea com células fusiformes; (C) a morfologia fusiforme se mantém em P3. (Objetiva 20X). Fonte: A autora, 2020.

5.2 Caracterização imunofenotípica da CTA por citometria de fluxo

As células-tronco mesenquimais apresentam marcadores de superfície específicos, como o CD105 (CD105⁺) e a ausência de outros como o CD45 (CD45⁻). Investigamos a expressão desses marcadores nas células cultivadas por citometria de fluxo, e nossos resultados mostram que 89,5% das CTA em P3 (apresentaram expressão de CD105 e somente 0,5% expressaram CD45), indicando que a cultura em P3 é constituída em sua maior parte por células mesenquimais (Gráfico 1).





Legenda: (A) Ausência de fluorescência no controle em FL2; (B) Histograma de FL2 (CD105-PE) mostrando que 89,5% das células expressam o marcador CD105 em P3; (C) Histograma de FL1 (CD45-FITC) mostrando que apenas 0,5% das células expressam o marcador CD45; (D) O Dot plot da dupla marcação com anticorpo anti-CD105 versus anticorpo anti-CD45 mostrou que 80,3% apresentaram marcação positiva para CD105 e marcação negativa para CD45. As Análises dos dados foram realizadas utilizando o BD CSampler software.

Fonte: A autora, 2020.

5.3 Identificação das CTA por imunofluorescência

A análise por microscopia confocal permitiu identificar que a maioria das CTA em (P3) apresentaram marcação difusa para CD105 e um padrão de marcação focal para CD90. A sobreposição de imagens na mostrou que os marcadores se distribuem em domínios distintos na superfície das células (Figura 21). Além disso, foi analisada a imunofluorescência das células CTA GFP⁺ (Figura 22).



Figura 21 – Microscopia confocal das CTA em P3

CD105

Legenda: (A) Células apresentam padrão de marcação difuso para CD 105; (B) Padrão de marcação focal para CD90; (C) Sobreposição das marcaçõespara CD105 e CD90. Azul: núcleo marcado com DAPI; Vermelho: marcação com CD105-PE; Verde: marcação com CD90-FITC. (Objetiva 40X).

Fonte: A autora,2020.



Figura 22 - Microscopia Confocal das CTA GFP+ em P3



5.4 Diferenciação in vitro da CTA nas linhagens adipogênica e osteogênica

As células em P3 foram cultivadas em meio de diferenciação específico para a diferenciação adipogênica e osteogênica por 21 dias. A capacidade de diferenciação nas linhagens adipogênica e osteogênica é um dos critérios para avaliação quanto à natureza mesenquimal da célula. Observamos a presença de vários vacúolos lipídicos no citoplasma das células, corados em vermelho pelo Oil Red (setas). Assim como a deposição de cálcio na matriz extracelular, corado em rosa pela Alizarina (setas) (Figura 23).



Figura 23 - Diferenciação das CTA nas linhagens adipogênica e osteogênica

Legenda: (A) Na diferenciação adipogênica as células diferenciadas em adipócitos apresentaram vacúolos lipídicos (setas) corados por Oil Red; (B) Na diferenciação osteogênica observou-se a deposição de cálcio na matriz extracelular (setas) corada por Alizarina (Objetiva 20X).Fonte: A autora, 2020.

5.5 Análise da pressão arterial sistólica dos animais

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida uma vez por semana, a partir da semana 0, antes da clipagem, até a semana seis ou oito quando ocorreu a eutanásia dos animais de cada grupo. Nos animais 2R1C foi observado um aumento significativo da PAS de 165 \pm 7 mmHg na semana 0 para 217 \pm 15 mmHg na semana um devido à estenose da artéria renal esquerda, o que resultou em níveis elevados até a semana quatro, quando foi realizado o transplante das CTA na região subcapsular do rim esquerdo. Na semana cinco,após o tratamento com as CTA, observamos queda abrupta nos valores da PAS nos animais 2R1C + CTA de 222 \pm 12 mmHg para 150 \pm 26 mmHg, chegando aos valores do SHAM de 148 \pm 15mmHg com a manutenção nesse patamar durante o restante do experimento nos grupos 15 e 30 dias após a injeção das células na capsula renal. Na semana oito foi registrado o valor de 225 \pm 9 mmHg no grupo 2R1C e 175 \pm 12mmHg no grupo 2R1C+CTA, indicando que o tratamento foi capaz de reduzir e manter a pressão arterial próximo a níveis basais (Gráfico 2). Todos os valores estatísticos da evolução da PAS ao longo das semanas experimentais (Tabela 1).




Legenda:Valores expressos como média ± desvio-padrão, n=6 animais por grupo. P=0,0001, (a) com relação ao grupo SHAM, (b) com relação ao grupo 2R1C (c) com relação ao grupo 2R1C + CTA. A estatística foi realizada pelo teste *two-way* ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A autora, 2020.

	Pressão	o Arterial Sistólica (mmHg)	
Semana	SHAM	2R1C	2R1C + CTA
0	155 <u>+</u> 12	165 <u>+</u> 7	161 <u>+</u> 8
1	147 <u>+</u> 16	217 <u>+</u> 15 ^a	204 <u>+</u> 13 ^a
2	146 <u>+</u> 18	206 <u>+</u> 22 ^a	195 <u>+</u> 16 ^a
3	151 <u>+</u> 10	210 <u>+</u> 12 ^a	201 <u>+</u> 18 ª
4	146 <u>+</u> 10	219 <u>+</u> 17 ^{a,c}	203 <u>+</u> 17 ^a
5	148 <u>+</u> 15	222 <u>+</u> 12 ^{a,c}	150 <u>+</u> 26 ^b
6	160 <u>+</u> 22	230 <u>+</u> 8 ^{a,c}	169 <u>+</u> 24 ^b
7	163 <u>+</u> 10	222 <u>+</u> 15 ^{a,c}	168 <u>+</u> 29 ^b
8	157 <u>+</u> 21	225 <u>+</u> 9 ^{a,c}	175 <u>+</u> 12 ^b

Tabela 1 - Evolução da pressão arterial sistólica (PAS)

Legenda: Valores da pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos experimentais durante 8 semanas. Na semana 4, ocorreu a injeção das CTA na capsula renal do grupo 2R1C + CTA Valores de média ± desvio padrão. (a) com relação ao grupo SHAM, (b) com relação ao grupo 2R1C (c) com relação ao grupo 2R1C + CTA.

5.6 Volume urinário e análise bioquímica

Nas semanas seis e oito, as amostras de urina foram coletadas com o auxílio de gaiolas metabólicas dos grupos experimentais para análise do volume urinário. No grupo experimental de seis semanas, ocorreu elevação do volume urinário nos animais clipados 2R1C 45d ($13 \pm 2ml$) quando comparado ao grupo SHAM 45d ($7 \pm 4ml$), que se manteve no grupo tratado 2R1C+CTA 15d ($13 \pm 2ml$) (Gráfico 3A) Nos grupos experimentais de oito semanas, os grupos não apresentaram alteração significativa SHAM 60d ($11 \pm 3ml$), 2R1C 60d ($13 \pm 3ml$) e 2R1C + CTA 30d ($9 \pm 6ml$) (Gráfico 3B).

Gráfico 3 - Gráfico do volume urinário



Legenda: Volume urinário obtido por 24 horas. Valores expressos como média ± desvio-padrão, n=6-10 animais por grupo; (A) grupo experimental 6 semanas - P=0,001; (B) grupo experimental 8 semanas - P=0,307. (a) com relação ao grupo SHAM. A estatística foi analisada pelo teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak. Fonte: A autora, 2020.

Para realização da análise bioquímica semiquantitativa utilizando as tiras reagentes, vários parâmetros foram analisados e os resultados foram expressos como negativo e positivo (em cruzes, de 1+ a 4+). O resultado da tira reagente foi negativo em todas as amostras de urina dos grupos experimentais de seis e oito semanas estudados para o urobinogênio, bilirrubina, ácido ascórbico. O nitrito apresentou resultado positivo apenas nos animais clipados do grupo experimental seis semanas - 2R1C 45d que apresentou valor de (1+). Não houve variação de pH entre os grupos, o qual permaneceu em torno de sete. Com relação à densidade urinária, verificou-se

que os animais apresentaram valores entre 1005 e 1010, todos dentro da faixa da normalidade.

O resultado foi negativo para presença de sangue na urina em todos os grupos. Com relação à presença de leucócito, foi detectado na urina de todos os grupos e os valores apresentados ficaram baixos entre 25 e 75 todos dentro da faixa da normalidade. O teste também foi positivo para detecção dos corpos cetônicos apenas nos grupos clipados 2R1C 45d e 2R1C 60d, que apresentaram valor de (1+), enquanto nos grupos tratados pelas células-tronco adiposas 2R1C+CTA15d e 2R1C + CTA30d o resultado foi negativo, semelhante aos respectivos SHAM 45d e SHAM 60d. As tiras reagentes detectaram a presença de proteína na urina de todos os grupos no valor de (2+), o que representa uma condição normal para a urina de ratos, uma vez que foi encontrada também nos animais controles SHAM 45 e SHAM 60d (Quadro 3).

Parâmetros	SHAM 45d	2R1C 45d	2R1C + CTA 15d	SHAM 60d	2R1C 60d	2R1C + CTA 30d
Bilirrubina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativa	Negativo	Negativo
Urobinogênio	Negativo	Negativo	Negativo	Negativa	Negativo	Negativo
Cetônicos	Negativo	1+	Negativo	Negativo	1+	Negativo
Ácido ascórbico	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Glicose	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Proteínas	2+	2+	2+	2+	2+	2+
Sangue	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
рН	7	7	7	7	7	7
Nitritos	Negativo	1+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Leucócitos	Ca. 75	Ca. 25	Ca. 25	Ca. 75	Ca.75	Ca.75
Densidade	1010	1005	1010	1010	1005	1005
Volume urinário	6 <u>+</u> 4	12 <u>+</u> 3	14 <u>+</u> 4	11 <u>+</u> 3	12 <u>+</u> 3	9 <u>+</u> 6

|--|

Nota: Amostras de urina foram coletadas nas semanas 6 ou 8 de acordo com o grupo experimental. Fonte: A autora, 2020.

5.7 Quantificação da creatinina, ureia e proteínas totais do plasma

Em amostras de plasma dos animais dos grupos experimentais de seis e oito semanas, foram avaliados os níveis de creatinina, ureia e proteínas totais. No grupo experimental de 6 semanas, os níveis da creatinina estavam significativamente elevado no grupo 2R1C 45d (0,45 \pm 0,09 mg/dL) quando comparado ao SHAM 45d (0,35 \pm 0,05 mg/dL) e sem diferença significativa comparado ao grupo 2R1C + CTA 15d (0,43 \pm 0,05 mg/dL) (Gráfico 4A). Já no grupo experimental de oito semanas, os níveis de creatinina não apresentaram diferenças entre os grupos SHAM 60d (0,41 \pm 0,04 mg/dL), grupo clipado R1C 60d (0,39 \pm 0,04 mg/dL) e o grupo tratado 2R1C + CTA CTA 30d (0,43 \pm 0,05 mg/dL) (Gráfico 4B).





Legenda: Valores expressos como média ± desvio-padrão, n=6-8 animais por grupo; (A) grupo experimental 6 semanas - P=0,024. (B) grupo experimental 8 semanas - P=0,153. (a) com relação ao grupo SHAM. A estatística foi analisada pelo teste *one-way* ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak. Fonte: A autora, 2020.

Foram avaliados no plasma os níveis de ureia. No grupo experimental de seis semanas, os níveis estavam significativamente elevados nos grupos clipado 2R1C 45d (53, 25 + 7,07 mg/dL) e tratado 2R1C + CTA 15d (51,33 + 7,31 mg/dL) comparado ao grupo SHAM 45d (42,25 + 6,32 mg/dL) (Gráfico 5A). No grupo experimental de oito semanas, os níveis não apresentaram diferenças entre os grupos. SHAM 60d (51,29 + 4,79 mg/dL); 2R1C 60d (49,29 + 7,97mg/dL); 2R1C + CTA 30d (48,83 + 13,23 mg/dL) (Gráfico 5B).

Grafico 5 – Níveis plasmáticos de ureia



Legenda: Valores expressos como média ± desvio-padrão, n=6-8 animais por grupo; (A) grupo experimental 6 semanas - P=0,011; (B) grupo experimental 8 semanas - P=0,871. (a) com relação ao grupo SHAM. A estatística foi analisada pelo teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak. Fonte: A autora, 2020.

Os níveis de proteínas totais no plasma dos grupos experimentais de seis e oito semanas não apresentaram diferenças. No grupo experimental de seis semanas os níveis foram: SHAM 45d ($6,24 \pm 0,33$); 2R1C 45d ($6,07 \pm 0,30$ g/dL) e 2R1C+ CTA 15d ($6,47 \pm 0,61$ g/dL) (Gráfico 6A). No grupo experimental de oito semanas os níveis foram SHAM 60d ($6,33 \pm 0,28$ g/dL); 2R1C 60d ($6,27 \pm 0,29$ g/dL) e 2R1C + CTA 30d ($6,37 \pm 0,72$ g/dL) (Gráfico 6B).







5.8 Análise macroscópica do rim

Na análise macroscópica dos rins o grupo controle SHAM (Figura 24A) apresenta simetria entre os rins direito e esquerdo. Os grupos clipados 2R1C 45d (Figura 24B) e 2R1C 60d (Figura 24C) apresentam assimétria renal com atrofia dos rins esquerdos e regiões de fibrose (região amarelada) e os rins direitos apresentam hipertrofia, mais intensa nos grupos 2R1C 60d. Não foram observadas diferença macroscópica entre os grupos clipados e os animais tratados 2R1C + CTA 15d (Figura 24D) e 2R1C + CTA 30d (Figura 24E).



Figura 24 - Análise macroscópica dos rins



Legenda: (A) Rim direito e esquerdo do grupo SHAM; (B) Rim direito e esquerdo do grupo 2R1C 45d; (C) Rim direito e esquerdo do grupo 2R1C 60d; (D) Rim direito e esquerdo do grupo 2R1C + CTA 15d; (E) Rim direito e esquerdo do grupo 2R1C + CTA 30d.
Fonte: A autora, 2020.

5.9 Análise do parênquima renal por microscopia de luz

A coloração com HE mostrou que na semana 6 o grupo SHAM 45d apresentou glomérulos e túbulos com organização típica do parênquima renal (Figura 25A e 25B) O grupo 2R1C 45d apresentou atrofia e esclerose glomerular, assim como desorganização tubular com obstrução do lúmen e perda de acidofilia, além da presença de cilindros hialinos (seta vermelha). Também foi observada a presença de infiltrado celular (seta preta) (Figura 25C e 25D). No grupo 2R1C+CTA 15d o tratamento com CTA indicou recuperação de danosseveros ao córtex renal onde podemos observar glomérulos e túbulos restaurados quando comparado ao grupo clipado (Figura 25E e 25F).



Figura 25 - Fotomicrografias de rim do grupo 6 semanas corados por HE

Legenda: (A) Córtex do grupo SHAM 45d - glomérulos e túbulos típicos; (B) Medula do grupo SHAM 45d - túbulos renais típicos; (C) Córtex do grupo 2R1C 45d -. glomérulos atrofiados e esclerosados (seta vermelha) e presença de infiltrado celular (seta preta); (D) Medula do grupo 2R1C 45d - túbulos desorganizados com presença de cilindros hialinos (seta vermelha) e infiltrado celular (seta preta), o grupo apresenta perda de acidofilia; (E) Córtex do grupo 2R1C + CTA 15d – glomérulos restaurados; (F) Medula do grupo 2R1C + CTA 15d. túbulos renais restaurados (Objetiva 20x). Fonte: A autora, 2020.

A coloração com HE mostrou que na semana oito o grupo SHAM 60d, apresentou glomérulos e túbulos com organização típica do parênguima renal (Figura 26A e 26B). O grupo 2R1C 60d apresentou atrofia e esclerose glomerular, assim como desorganização tubular com obstrução do lúmen (seta vermelha) e perda de acidofila, além de presença de cilindros hialinos (seta vermelha). Também foi observada uma incidência maior de infiltrado celular (seta preta) (Figura 26C e 26D). Nos animais 2R1C+CTA 30d, o parênquima renal apresentou-se degenerado e com presença de infiltrado inflamatório, porém o tratamento com CTA indicou recuperação de danos severos ao córtex e medula do rim, onde se pode observar glomérulos e túbulos restaurados (Figura 26E e 26F).



Figura 26 - Fotomicrografias de rim do grupo 8 semanas corados por HE

Legenda: (A) Córtex do grupo SHAM 60d - glomérulos e túbulos típicos; (B) Medula do grupo SHAM 60d - túbulos renais típicos; (C) Córtex do grupo 2R1C 60d -. glomérulos atrofiados e esclerosados (seta vermelha) e presença de infiltrado celular (seta preta); (D) Medula do grupo 2R1C 60d - túbulos desorganizados com presença de cilindros hialinos (seta vermelha) e infiltrado celular (seta preta), o grupo apresenta perda de acidofilia; (E) Córtex do grupo 2R1C + CTA 30d – glomérulos restaurados e presença de infiltrado inflamatório (seta preta); (F) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos renais restaurados e presença de infiltrado inflamatório (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos renais restaurados e presença de infiltrado inflamatório (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos renais restaurados e presença de infiltrado inflamatório (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos renais restaurados e presença de infiltrado inflamatório (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos renais restaurados e presença de infiltrado inflamatório (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos renais restaurados e presença de infiltrado inflamatório (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos renais restaurados e presença de infiltrado inflamatório (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos renais restaurados e presença de infiltrado inflamatório (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos renais restaurados e presença de infiltrado inflamatório (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos renais restaurados e presença de infiltrado inflamatório (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos renais restaurados e presença de infiltrado inflamatório (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos celular (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos celular (seta preta); (C) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. - túbulos celular (seta preta); (C)

Fonte: A autora, 2020.

A coloração por ácido periódico-Schiff, evidencia carboidratos, como glicogênio, glicoproteínas, proteoglicanos, geralmente encontrados em tecidos

conjuntivos, muco e membranas basais. Na semana seis, o grupo SHAM 45d, apresentou regiões coradas em magenta nos glomérulos que evidenciam a membrana basal, ao redor a cápsula de Bowman e ainda na região de borda em escova dos TCP (Figura 27A) e marcação de conteúdos glicoprotéicos na luz dos tubúlos (Figura 27B. O grupo 2R1C 45d apresentou maior intensidade de coloração nos glomérulos e na membrana da cápsula de Bowman, ainda se observou intensa coloração em depósitos presentes tanto no córtex quanto na medula (Figura 27C e 27D). Já o grupo 2R1C + CTA 15d, apresentou redução na intensidade da coloração nos glomérulos, assim como ao redor da cápsula de Bowman, onde observou-se também uma diminuição dos depósitos presentes no grupo clipado (Figura 27E e 27F).

Figura 27 - Fotomicrografias de rim do grupo 6 semanas corados por ácido periódico-Schiff



Legenda: (A) Córtex do grupo SHAM 45d que apresenta coloração glomérulo, capsula de Bowman, que evidencia a membrana basal, além de coloração na borda em escova dos túbulos contorcidos proximais (setas); (B) Medula do grupo SHAM 45d que apresenta coloração em conteúdos glicoproteicos presentes nos tubulos (seta); (C) Córtex do grupo 2R1C 45d apresenta coloração mais intensa nos glomérulos e cápsula de Bowman (setas); (D) Medula do grupo 2R1C 45d apresenta intensa coloração em depósitos presentes (seta); (E) Córtex do grupo 2R1C + CTA 15d apresenta menor intensidade da coloração nos glomérulos ,na cápsula de Bowman. (seta); (F) Medula do grupo 2R1C + CTA 15d apresenta coloração em conteúdos glicoprotéicos presentes nos túbulos (Objetiva 20x).

A coloração por ácido periódico-Schiff mostrou que na semana oito o grupo SHAM 60d apresentou regiões coradas em magenta nos glomérulos que evidencia a membrana basal, ao redor a cápsula de Bowman e ainda na região de borda em escova dos TCP (Figura 28A)e marcação de conteúdos glicoprotéicos na luz dos tubúlos (Figura 28B). O grupo 2R1C 60d exibiu maior intensidade de coloração nos glomérulos e na membrana da cápsula de Bowman, ainda se observou intensa coloração em depósitos presentes tanto no córtex quanto na medula (Figura 28C e 28D). Já o grupo 2R1C + CTA 30d, mostrou a manutenção de intensa coloração nos glomérulos, assim como ao redor da cápsula de Bowman, que apresentou intensa coloração em depósitos presentes tanto no córtex quanto na medula (Figura 28E e 28F).

Figura 28 - Fotomicrografias de rim do grupo 8 semanas corados por ácido periódico-Schiff



Legenda: (A) Córtex do grupo SHAM 60d que apresenta coloração no glomérulo, capsula de Bowman, que evidencia a membrana basal, além de coloração na borda em escova dos túbulos contorcidos proximais (setas); (B) Medula do grupo SHAM 60d que apresenta coloração em conteudos glicoproteicos presentes nos túbulos (seta); (C) Córtex do grupo 2R1C 60d apresenta coloração mais intensa nos glomérulos e cápsula de Bowman (setas); (D) Medula do grupo 2R1C 60d apresenta intensa coloração em depósitos presentes (seta); (E) Córtex do grupo 2R1C + CTA 30d apresenta manutenção de intensidade da coloração nos glomérulos e na cápsula de Bowman (seta); (F) medula do grupo 2R1C + CTA 30d apresenta intensa coloração em depósitos presentes (seta).

Fonte: A autora, 2020

5.10 Marcação das fibras colágenas

A coloração por Picro Sirius Red na semana seis mostrou que o grupo SHAM 45d apresentou uma quantidade basal de fibras de colágeno, ocorrendo principalmente ao redor dos glomérulos, túbulos e vasos sanguíneos (Figura 29A e 29B). Entretanto, o grupo clipado 2R1C 45d apresentou intensa marcação de fibras colágenas no parênquima renal tanto no córtex quanto na medula (Figura 29C e 29D). O grupo 2R1C+CTA 15d apresentou o rim com parênquima restaurado em relação ao grupo 2R1C 45d e semelhante ao grupo SHAM 45d, com marcação basalde colágeno ao redor dos glomérulos e túbulos (Figura 29E e 29F).

O grupo controle SHAM 60d apresentou uma quantidade basal de fibras de colágeno, ocorrendo principalmente ao redor dos glomérulos, túbulos e vasos sanguíneos (Figura 30A e 30B). Entretanto, o grupo clipado 2R1C 60d apresentou intensa marcação para fibras colágenas uma vez que a fibrose já está bem estabelecida (Figura 30C e 30D). Após o tratamento com CTA o grupo tratado 2R1C+CTA 30d apresentou o rim com parênquima tão acometido pela fibrose quanto o grupo clipado 2R1C 60d, indicando que o tratamento com CTA não foi eficaz para a restauração do parênquima renal em tempo tardio (Figura 30E e 30F).



Figura 29 - Fotomicrografias de rim do grupo 6 semanas corado com Picro Sirius Red

Legenda: (A) Córtex do grupo SHAM 45d - apresenta deposição de colágeno, ao redor dos glomérulos, túbulos e vasos sanguíneos (seta); (B) Medula do grupo SHAM 45d - apresentam deposição de colageno, ao redor túbulos e vasos sanguíneos (seta); (C) Córtex do grupo 2R1C 45d - apresenta acúmulo de colágenos no parênquima renal (seta); (D) Medula do grupo 2R1C 45d – acúmulo de colágeno no parênquima renal (seta); (E) Córtex do grupo 2R1C + CTA 15d –apresenta deposição reduzida de colágeno ao redor dos glomérulos, túbulos e vaso sanguíneos (seta); (F) Medula do grupo 2R1C + CTA 15d. – apresenta deposição reduzida de colágeno ao redor dos túbulos e vasos sanguíneos (seta); (O) do grupo 2R1C + CTA 15d.



Figura 30 - Fotomicrografias de rim do grupo 8 semanas corado com Picro Sirius Red

Legenda: (A) Córtex do grupo SHAM 60d - apresenta deposição de colágeno, ao redor dos glomérulos, túbulos e vasos sanguíneos (seta); (B) Medula do grupo SHAM 60d - apresenta deposição de colageno, ao redor túbulos e vasos sanguíneos (seta); (C) Córtex do grupo 2R1C 60d apresenta intenso acúmulo de colágenos no parênquima renal (seta); (D) Medula do grupo 2R1C 60d – apresenta intenso acúmulo de colágeno no parênquima renal (seta); (E) Córtex do grupo 2R1C + CTA 30d –apresenta marcação intensa para colágeno no parênquima renal (seta); (F) Medula do grupo 2R1C + CTA 30d. – apresenta marcação intensa para colágeno no parênquima renal (seta). (Objetiva 20X.).

5.11 Quantificação das Fibras colágenas

As fibras colágenas foram quantificadas a partir de fotomicrografias de rim corados com Picro Sirius Red pelo programa Image J. O corante marca em vermelho as fibras colágenas, a porcentagem de área das regiões coradas foi mensurada. No grupo experimental de seis semanas, o grupo clipado 2R1C 45d (13,43 ± 0,4) apresentou grande deposição de fibras colágenas no parênguima renal guando comparado ao grupo controle SHAM 45d (4,83 + 0,51). Já no grupo tratado 2R1C + CTA 15d (5,74 ± 0,37), a quantidade de fibras colágenas se apresentou reduzida quando comparada ao grupo clipado (Gráfico 7A). No grupo experimental de oito semanas o grupo de animais clipados 2R1C 60d (15,96 ± 0,14) apresentou também grande deposição de fibras colágenas quando comparado ao grupo controle SHAM 60d (5,04 + 0,12). O grupo tratado 2R1C + CTA 30d (12,82 + 4,65) não apresentou redução na quantidade de fibras colágenas comparado ao grupo clipado (Gráfico 7B).







5.12 Localização das células CTA GFP⁺ no rim por imunoperoxidase

Através da técnica de imunoperoxidase, foi possível localizar as células GFP⁺ no córtex renal, em sua maioria no interstício próximo aos túbulos, 15 dias após inóculo das células na região subcapsular (Figura 31).

Figura 31 – Fotomicrografia da CTA GFP⁺ no rim no grupo 6 semanas



2R1C + CTA 15d

Legenda: (A) CTA GFP⁺ (seta vermelha) na região do córtex, especificadamente no interstício (Objetiva 40X); (B) Inserte da fotomicrografia A (Objetiva 100X); (C) CTA GFP⁺ (seta Vermelha) localizadas na região do córtex (Objetiva 40X); (D) Inserte da fotomicrografia C (Objetiva 100X).

Fonte: A autora, 2020.

A técnica de imunoperoxidase permitiu localizar as células GFP⁺ no parênquima renal totalmente desorganizado, característico do grupo 2R1C + CTA 30d, dias após injeção das células na região subcapsular (Figura 32).



Figura 32 – Fotomicrografia da CTA GFP+ no rim no grupo 8 semanas

Legenda: (A) CTA GFP⁺ (seta vermelha) no parênquima renal próximo as áreas de infiltrado inflamatório (seta preta) (Objetiva 40X); (B) Inserte da fotomicrografia A (Objetiva100X); (C) CTA GFP⁺ (seta vermelha) no parênquima renal próximo as áreas de infiltrado inflamatório (seta preta) (Objetiva40X); (D) Inserte da fotomicrografia C (Objetiva100X).
 Fonte: A autora, 2020.

5.13 Análise da ultraestrutura renal

A microscopia eletrônica de transmissão permitiu o estudo da ultraestrutura dos componentes da barreira de filtração glomerular. Os Grupos SHAM apresentaram barreira de filtração típica com pedicelos e células endoteliais preservados (Figura 33A e 33B). Nos grupos 2R1C 45d e 2R1C 60d houve maior desorganização glomerular com espessamento da membrana basal glomerular e diminuição de regiões de fenda de filtração devido a uma menor individualização dos pedicelos (Figuras 33C e 33D). Entretanto após o tratamento com as CTA a lâmina basal se mostrou mais delgada, porém ainda com região de espessamento no grupo 2R1C + CTA 15d. Os pedicelos

se apresentaram bem individualizados com maior número de fendas de filtração (Figura 33E). Resultado distinto foi encontrado no grupo 2R1C + CTA 30d, que mesmo após o tratamento com as CTA não apresentaram restauração dos componentes da barreira de filtração, apresentando danos compatíveis aos encontrados nos animais clipados como espessamento da membrana basal, pedicelos hipertrofiados e fusionados com redução da fenda de filtração (Figura 33F).



Figura 33 - Eletromicrografia da ultraestrutura da barreira de filtração glomerular



Fonte: A autora, 2020.

5.14 Mensuração da atividade das enzimas antioxidantes e dano oxidativo

Para o estudo do estresse oxidativo a atividade das enzimas antioxidantes foi analisada em homogenatos de rins esquerdos: A catalase é uma enzima antioxidante, que decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, evitando que ocorra o estresse oxidativo na célula. No grupo experimental de seis semanas não foram observadas diferenças entre os grupos conrole SHAM 45d ($6,23 \pm 2,21$); clipado 2R1C 45d ($7,11 \pm 2,94$) e tratado 2R1C+CTA15 ($4,80 \pm 2,03$) (Gráfico 8A). A atividade da catalase no grupo experimental de oito semanas apresentou-se reduzida no grupo clipado 2R1C 60d ($15,25 \pm 8,71$), que se manteve no grupo tratado 2R1C+CTA 30d ($13,68 \pm 9,65$), diferindo ambos do grupo controle SHAM 60d ($25,76 \pm 3,96$) (Gráfico 8B).

Gráfico 8 – Atividade da catalase renal



Legenda: Valores expressos como média ± desvio-padrão, n=8-10 animais por grupo. (A) grupo experimental 6 semanas - P= 0,143; (B) grupo experimental 8 semanas - P=0,004. (a) com relação ao grupo SHAM. (b) com relação ao grupo 2R1C. A estatística foi analisada pelo teste one-way ANOVA seguido o pósteste de Holm-Sidak.

Fonte: A autora, 2020.

Homogenatos de rins esquerdos foram submetidos à análise da atividade da GPx, ela é responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, fazendo parte do sistema de defesa antioxidante enzimático celular, juntamente com a catalase. Não foram observadas diferenças na atividade da GPx entre os grupos, independente do grupo experimental seis semanas e oito semanas No grupo experimental seissemanas, os grupos apresentaram os seguintes valores: controle SHAM 45d (3,17 \pm 0,71); clipados 2R1C 45d (4,11 \pm 2,10); tratados 2R1C+CTA 15d (3,80 \pm 1,86) (Gráfico 9A). No grupo experimental de 8 semanas apresentaram os valores: Controle SHAM 60d (15,38 \pm 3,27); clipados 2R1C 60d (17,82 \pm 3,30); tratados 2R1C+CTA 30d (21,32 \pm 9,61) (Gráfico 9B).



Gráfico 9 – Atividade da glutationa peroxidase renal

Legenda: Valores expressos como média ± desvio-padrão, n=8-10 animais por grupo. (A) grupo experimental 6 semanas - P= 0,450; (B) grupo experimental 8 semanas - P= 0,117; (a) com relação ao grupo SHAM. (b) com relação ao grupo 2R1C. A estatística foi analisada pelo teste *one-way* ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak. Fonte: A autora, 2020.

Para o estudo do dano oxidativo proteico, os rins esquerdos foram homogeneizados e proteínas carboniladas foram quantificados após reação com 2,4 -Dinitrofenilhidrazona (DNPH) em HCL 2M por espectrofotometria, uma vez que uma das consequências do estresse oxidativo nas células é a oxidação das proteínas que levam a perda de função proteica. Desse modo, proteínas carboniladas são marcadores de dano oxidativo às proteínas. No grupo experimental de seis semanas, não foram observadas diferenças entre os grupos controle SHAM 45d (0,11 \pm 0,05); clipado 2R1C 45d (0,13 \pm 0,07) e tratado 2R1C+CTA15 (0,11 \pm 0,07) (Gráfico 10A). No grupo experimental de oito semanas os animais clipados 2R1C 60d (0,15 \pm 0,04) apresentaram elevação significativa de proteínas carboniladas, indicando dano proteico comparado ao grupo SHAM 60d (0,10 \pm 0,01). O grupo tratado 2R1C+CTA 30d (0,12 \pm 0,04) não apresentou diferença entre os grupos controle e clipados (Gráfico 10B).

Gráfico 10 – Quantificação de proteínas carboniladas



Legenda: Valores expressos como média ± desvio-padrão, n=8-10 animais por grupo; (A) grupo experimental 6 semanas - P= 0,711; (B) grupo experimental 8 semanas P= 0,034; (a) com relação ao grupo SHAM. A estatística foi analisada pelo teste *one-way* ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak. Fonte: A autora, 2020.

Ainda para o estudo do dano oxidativo proteíco, os conteúdos de 3-nitrotirosina, marcador de dano proteico, foram quantificados em homogenatos dos rins esquerdos pela técnica Western Blotting. Não foram apresentadas diferenças significativas entre os grupos. O grupo experimental 6 semanas apresentou os seguintes valores: SHAM 45d (0,78 \pm 0,37); 2R1C 45d (0,90 \pm 0,64) e 2R1C+CTA15 (1,20 \pm 0,47) (Gráfico 11A). O grupo experimental oito semanas apresentou os seguintes valores: SHAM 60d (0,58 \pm 0,28); 2R1C 60d (1,65 \pm 1,17) e 2R1C+CTA 30d (0,90 \pm 0,64) (Gráfico 11B).



Gráfico 11 - Quantificação da 3-Nitrotirosina

Legenda: Valores expressos como média ± desvio-padrão, n=5-8 animais por grupo;(A) grupo experimental 6 semanas - P= 0,406; (B) grupo experimental 8 semanas -P= 0,094; (a) com relação ao grupo SHAM. A estatística foi analisada pelo teste *one-way* ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak. Fonte: A autora, 2020.

Para mensuração da peroxidação lipídica, os conteúdos de 4-Hidroxinonenal foram quantificados em homogenatos dos rins esquerdos pela técnica Western Blotting. O grupo de seis semanas não apresentou diferença entre os grupos, apresentando os seguintes valores: SHAM 45d $(0,79 \pm 0,19)$; 2R1C 45d $(0.91 \pm 0,33)$ e 2R1C+CTA15 $(0,94 \pm 0,47)$ (Gráfico 12A). No grupo experimental de oito semanas os animais clipados 2R1C 60d $(1,47 \pm 1,01)$, apresentaram elevação significativa de 4HNE, comparado ao grupo SHAM 60d $(0,33 \pm 0,10)$, indicando que esses animais sofreram dano lipídico. O grupo tratado 2R1C+CTA 30d $(0,77 \pm 0,67)$, não apresentou diferença entre os grupos controle e clipado. (Gráfico 12B).



Gráfico 12 – Quantificação da 4-Hidroxinonenal



6 DISCUSSÃO

A estenose da artéria renal provoca redução de fluxo sanguíneo no rim, resultando no desenvolvimento da hipertensão renovascular e nefropatia isquêmica. A nefropatia isquêmica é caracterizada por inflamação, estresse oxidativo, perda microvascular e fibrose que, consequentemente, podem levar à insuficiência funcional (OLIVEIRA-SALES & BOIM, 2016). Resultados promissores obtidos com experimentos utilizando as células-tronco mesenquimais no tratamento de diversas doenças, incluindo as patologias renais, elevam essas células como possíveis instrumentos no tratamento dos danos provocados pela estenose da artéria renal (EIRIN et al., 2012; PEIRED et al. 2016; VIZOSO et al., 2019).

O tecido adiposo tem se mostrado uma ferramenta atraente para aplicação na medicina regenerativa, em virtude de ser uma fonte rica em células-tronco mesenquimais (GARCIA et al. 2016; KOCAN et al. 2017; LEE et al. 2014;MUSHAHARY et al; 2018). Para serem caracterizadas como células mesenquimais, essas células devem ser aderentes ao plástico, possuir a presença dos marcadores CD90, CD73 e CD105, assim como ausência de marcador CD45, entre outros, além de possuir a capacidade de se diferenciar em linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica quando submetidas a meios de diferenciação específicos (BROWN et al., 2019; LEE et al., 2014; MUSHAHARY et al., 2018).

Nossos resultados mostram que foi possível isolar células mesenquimais obtidas do tecido adiposo subcutâneo de ratos. Após expansão *in vitro*, a imunofenotipagem por citometria de fluxo confirmou que 89,5% das células em cultivo expressavam CD105 e somente 0,5% CD45. Foi possível ainda identificar por imunofluorescência, a expressão de CD90 pela maiorida das células em P3. Os resultados foram consistentes quanto às características fenotípicas (FRASER et al., 2008; KERN et al., 2006; MOHAMMADI-MAHDIABADI et al., 2020; WAGNER et al., 2005).

Ao serem cultivadas em meios específicos, as células apresentaram uma resposta típica de linhagem adipogênica, com células apresentando gotículas de lipídio evidenciadas pelo Oil red e resposta típica de linhagem osteogênica com depósito de cálcio marcado pela Alizarina. Marcações semelhantes foram

encontradas por nosso grupo no trabalho de Dias et al., (2018), que foram identificadas também no trabalho do grupo Fuoco et al., (2016) assim como pelos pesquisadores Abdanipour, Tiraihi e Delshadna (2011) na confirmaçao da natureza mesenquimal das CTA, corroborando nossos resultados da diferenciação nas linhagens adipogênica e osteogênica.

A estenose da artéria renal induzida pelo modelo 2R1C leva à rarefação vascular, que ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), o que causa a hipertensão renovascular. O controle dessa situação é problemático, uma vez que muitos fármacos anti-hipertensivos, incluindo bloqueadores do SRAA nem sempre são eficazes e 60% dos pacientes são refratários ao tratamento (OLIVEIRA-SALES et al., 2013). Já está bem descrito na literatura a capacidade das células-tronco mesenquimais impedirem o aumento progressivo da pressão arterial na hipertensão renovascular em modelos experimentais (LIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019; OLIVEIRA-SALES & BOIM, 2016; OLIVEIRA-SALES et al., 2013).

Nossos resultados mostraram uma redução significativa importante nos valores da pressão arterial no grupo tratado 2R1C + CTA na quinta semana. Uma semana após o início do tratamento com as células, a PAS apresentou valores bem próximos ao grupo SHAM que se mantiveram até a oitava semana de experimento. Em trabalho anterior (Lira et al., (2017), nosso grupo identificou a redução da expressão de renina, enzima conversora de angiotensina e receptores de angiotensina II (AT1R) nos grupos tratados pelas células mesenquimais de medula óssea, assim como regulação positiva na expressão do receptor de angiotensina II (AT2R), confirmando o efeito renoprotetor dessas células.

Assim sugerimos que as CTA também podem regular positivamente a expressão de AT2R, inibindo os receptores AT1R com efeito renoprotetor que leva à queda e manutenção da PAS em níveis basais nos animais tratados, uma vez que os receptores de angiotensina II AT1R e AT2R possuem efeitos contrários. Enquanto o AT1R produz efeitos fisiopatológicos tais como vasoconstrição, proliferação, fibrose, estresse oxidativo e inflamação, a ativação do AT2R impede os efeitos fisiopatológicos induzidos por AT1R e exerce efeitos vasodilatadores, antifibrótico, antiproliferativo e anti-inflamatórios e efeitos anti-hipertensivos na doença renal (HALLBERG et al. 2018; WANG et al. 2017).

Para a o estudo da função renal, o volume urinário foi coletado por 24 horas e nossos resultados no grupo experimental de seis semanas mostraram elevação

significativa no volume urinário nos animais clipados 2R1C 45d quando comparado ao grupo SHAM 45d, que se manteve no grupo tratado 2R1C+CTA 15d. Esse resultado está de acordo com o descrito na literatura onde Oliveira-Sales et al. (2013) observou aumento do volume urinário em animais 2R1C que não foi corrigido pelo tratamento com as CTM, indicando um mecanismo deficiente de capacidade de concentração urinária nos primeiros 15 dias. Segundo o autor, uma possível justificativa é que com a rarefação microvascular, a via de acesso do hormônio antidiurético ao ducto coletor seja dificultada, contribuindo para o aumento do volume urinário nos animais 2R1C 45d.

Já no grupo experimental de 8 semanas, não foram observadas diferenças significativas quanto ao volume urinário entre os grupos, SHAM 60d, 2R1C 60d e 2R1C + CTA 30d. Esse resultado pode ser reflexo da compensação funcional do rim contralateral, que sofre hipertrofia e o equilíbrio funcional fica restabelecido (AL-SURAIH et al., 2014; SORINO et al., 2018). Sendo assim, sugerimos que esse mecanismo aconteça em algum momento entre 45 e 60 dias e, por isso, não foram encontradas diferenças significativas nos grupos clipados por 60 dias.

Com relação à uroanálise por fita reagente, nossos resultados indicaram a presença de corpos cetônicos nos animais clipados 2R1C 45d e 60d. Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Lira (2017) nos animais clipados 2R1C 45d. A mensuração dos corpos cetônicos é recomendada para o diagnóstico de cetoacidose diabética e a avaliação de sua gravidade, em virtude de serem produtos da quebra de ácidos graxos, que ocorre no diabetes melittus tipo 1 não tratada. A uroanálise semiquantitativa vem sendo questionada quanto a sua eficiência. Novas diretrizes indicam a análise sanguínea para detecção precoce e mais eficaz das cetonas (HELMERSSON-KARLQVIST et al., 2019; MISRA & OLIVER; 2015). Contudo, não foi identificada a presença de glicose na urina, que consiste num dos principais sintomas do diabetes (FERRANNINI, 2011).

No grupo 2R1C 45d foi detectada presença de nitritos, que indica presença de bactérias na urina capazes de converter nitrato em nitrito, sendo o indicativo de infecção urinária, porém a análise semiquantitativa está relacionada à taxas relativamente altas de erros nos resultados de infecção em comparação com o padrão-ouro que é a urinocultura (Masajtis-Zagajewska & Nowicki , 2017). Não foi observada presença anormal de leucócitos na urina, um fator que se soma à presença de nitritos para caracterizar a infecção urinária (MASAJTIS-ZAGAJEWSKA &

NOWICKI, 2017). Em outros trabalhos do nosso grupo que usaram o mesmo modelo experimental e análise semiquantitativa, a presença de nitritos não foi identificada na urina (LIRA, 2017; FERNANDES, 2017)

Ao realizar análise quantitativa da ureia, creatinina e proteínas totais no plasma sanguíneo, o grupo experimental de seis semanas, apresentou níveis de creatinina significativamente elevados no grupo 2R1C 45d quando comparado ao SHAM 45d e sem diferença significativa comparado ao grupo 2R1C \pm CTA 15d. Resultados semelhantes foram encontrados por nosso grupo num mesmo modelo e tempo experimental em animais tratados com células-tronco mesenquimais de medula óssea (AZEVEDO, 2019; LIRA, 2017). Já no grupo experimental de 8 semanas, os níveis de creatinina não apresentaram diferenças entre os grupos SHAM 60d, grupo clipado 2R1C 60d e o grupo tratado 2R1C \pm CTA 30d. A dosagem da creatinina plasmática fornece informação importante sobre a função renal, já que praticamente toda a creatinina é filtrada no glomérulo e excretada no túbulo proximal (HUIDOBRO; TAGLE & GUZMÁN, 2018).

No grupo experimental seis semanas, os níveis de ureia nos animais clipados 2R1C 45d e tratados 2R1C + CTA 15d estavam significativamente elevados quando comparado ao grupo SHAM 45d, indicando que o tratamento com CTA não implicou na redução da ureia plasmática. Resultados diferentes foram observados em nosso grupo, utilizando mesmo modelo e tempo experimental no tratamento com células-tronco mesenquimais de medula óssea, que mostrou redução significativa nos níveis da ureia entre animais tratados comparado aos clipados (AZEVEDO, 2019; LIRA, 2017). No grupo experimental de 8 semanas, os níveis da ureia não apresentaram diferenças entre os grupos.

Tanto os resultados elevados da creatinina quanto da ureia no plasma refletem uma redução na taxa de filtração glomerular segundo Rota et al., (2019). Assim, sugerimos que após 15 dias de tratamento com CTA, os animais apresentem baixa taxa de filtração glomerular com consequente aumento de creatinina e uréia sérica uma vez que não houve tempo hábil para compensação funcional pelo rim contralateral. A mesma resposta foi observada por Zoja et al. (2018) que não identificaram redução significativa no valor de creatinina sérica após 15 e 30 dias do uso de CTM de medula óssea em ratos com lesão renal crônica induzida por adriamicina. Ambos os grupos experimentais de 6 e 8 semanas não apresentaram diferenças nos níveis de proteínas totais no plasma. Resultado diferente foi encontrado nos trabalhos de Azevedo (2019) e Lira (2017), onde o grupo 2R1C 45d apresentou redução nos níveis de proteínas no plasma e elevação nos níveis em animais tratados com células-tronco mesenquimais de medula óssea no grupo 2R1C 45d. Apesar de nossos resultados para os valores de proteínas totais indicarem que não ocorreu dano a barreira de filtração dos glomérulos dos animais, cabe ressaltar que está bem documentado na literatura casos de indivíduos que possuem doença renal crônica e são assintomáticos, apresentando funções renais normais. Portanto a avaliação da função renal somente pela análise bioquímica não deve ser utilizada como parâmetro de diagnóstico da nefropatia isquêmica (KHATAMI, 2013; ROMAGNANI et al., 2017; ROTA el al., 2019).

A estenose unilateral da artéria renal provoca assimetria renal. O rim submetido à estenose apresenta atrofia, decorrente da hipoperfusão, enquanto o rim contralateral apresenta hipertrofia, em virtude da compensação renal, o que caracteriza uma condição importante no aspecto clínico da nefropatia isquêmica, sendo os exames por imagem essenciais no diagnóstico da doença (KHATAMI, 2013). Numa análise qualitativa, foi possível identificar a assimetria anatômica dos rins nos modelos 2R1C. Nossos resultados estão alinhados ao descrito na literatura anteriormente (CHENG et al., 2009; LIRA et al., 2017; MORTENSEN et al., 2016), pois foi possível observar os dois grupos de animais clipados com rins esquerdos atrofiados e direitos hipertrofiados, sobretudo nos grupos 2R1C 60d. Não foi observado diferenças evidentes entre os rins esquerdos dos grupos tratados 2R1C + CTA 15d e 2R1C + CTA 30d.

Para avaliar a resposta dos rins clipados ao tratamento com CTA, foi realizada a análise histológica do parênquima renal utilizando diferentes colorações. Na coloração por HE, após 15 dias de tratamento com CTA, observamos evidente restauração do parênquima renal, com organização histológica semelhante ao grupo SHAM 45d. Esse resultado também foi encontrado por nosso grupo em trabalho anterior utilizando células mesenquimais de medula óssea (LIRA et al., 2017). Entretanto, no grupo 30 dias após o tratamento com CTA, foi observado certa restauração de glomérulos e túbulos, porém, com grande presença de infiltrado inflamatório no interstício indicativo de lesão no parênquima renal. Para avaliar a membrana basal, realizamos a coloração por ácido periódico-Schiff e observamos que os animais 2R1C apresentaram espessamento da membrana basal glomerular, da capsula de Bowman e dano tubular, como já relatado em trabalho anterior pelo nosso grupo em Oliveira et al.; 2019 e no trabalho de Wang et al.; 2018. No grupo clipado com 15 dias após o tratamento, a membrana basal glomerular e a cápsula de Bowman apresentaram-se menos espessas e com túbulos mais preservados, indicando que o tratamento foi capaz de prevenir o espessamento, o que também foi observado pelo nosso grupo em Oliveira et al., (2019). Já no grupo clipado com 30 dias após o tratamento, o espessamento tanto da membrana basal glomerular como da cápsula de Bowman se mantiveram assim como o dano tubular, indicando que o tratamento não foi capaz de prevenir o espessamento da membrana basal

Pela análise quantitativa dos cortes histológicos corados por Picro Sirius Red, constatamos a intensa deposição de fibras colágenas no interstício renal dos animais clipados, observado também por Wang et al., (2019) usando o mesmo modelo. No grupo 2R1C 60d a deposição de fibras colágenas, fica mais evidente, indicando fibrose mais acentuada nesses animais. Nos animais clipados com 15 dias após o tratamento, observamos parênquima renal com histologia muito semelhante ao grupo SHAM, com marcação positiva para colágeno restrita ao entorno dos glomérulos, túbulos e vasos sanguíneos. Resultado semelhante foi encontrado por nosso grupo em Lira et al., (2017). Em outro trabalho do nosso grupo, Azevedo (2019) identificou no mesmo modelo experimental que os animais com 15 dias, após o tratamento com células-tronco mesenquimal de medula óssea, apresentaram o equilíbrio entre metaloproteinase transmembrana e inibidores de metaloproteinase tecidual, de forma a impedir a progressão da fibrose renal. Entretanto, em nossos resultados para os grupos clipados com 30 dias após tratamento, não foi observado um efeito antifibrótico das CTA uma vez que existe um quadro de intensa fibrose como encontrado nos grupos 2R1C 60d.

O estudo por microscopia eletrônica de transmissão confirmou os achados observados nas análises por microscopia de luz. A análise ultraestrutural mostrou em detalhes a desorganização glomerular, com espessamento da membrana basal, hipertrofia e fusão de pedicelos, perda da organização endotelial e da fenda de filtração nos grupos clipados 2R1C 45d e 2R1C 60d. Tais achados são característicos

dos danos ultraestruturais encontrados em casos de lesão renal (CHEN et al., 2019; KURIEN et al., 2016; ZHANG et al., 2019).

No grupo tratado com CTA e eutanasiado após 15 dias - 2R1C + CTA 15d, observamos uma preservação da barreira de filtração, ainda que apresente regiões com espessamento na membrana basal. Resultado semelhante foi encontrado por nosso grupo no trabalho de Oliveira et al., (2019), onde foi utilizado o mesmo modelo experimental com uso das células mononucleares da medula óssea com o tratamento. Porém, após 30 dias do tratamento com CTA, não houve preservação ultraestrutural dos componentes da barreira de filtração que se apresentaram danificados tanto quanto nos grupos clipados.

Os resultados encontrados nos grupos clipados e no grupo tratado por 30 dias são relacionados às mudanças morfológicas nos pedicelos que acontecem em resposta ao estresse e lesões aos quais os podócitos são submetidos. Acredita-se que a hipertrofia podocitária seja uma forma de compensação que visa reduzir a área deixada por podócitos perdidos no tufo glomerular, assim como a perda do padrão interdigitante dos podócitos, indicando que a barreira de filtração não está intacta (KRIZ et al., 2013; REISER & ALTINTAS, 2016). A perda da interdigitação podocitária foi muito bem evidenciada pelo nosso grupo por meio da microscopia eletrônica de varredura em animais clipados no trabalho Oliveira et al., (2019). A fusão podocitária, encontrada nos animais, também foi relatada anteriormente no trabalho de Liu et al., (2015), como sendo uma das consequências da isquemia provocada pela estenose da artéria renal esquerda.

A estenose da artéria renal esquerda diminui a perfusão renal, provocando a superprodução de renina com consequente ativação SRAA que provoca uma resposta endócrina sistêmica cujas ações nos rins e glândulas suprarrenais regulam a pressão arterial, volume intravascular e balanço eletrolítico. A hiperatividade do SRAA possui estreita relação com o modelo 2R1C, uma vez que a elevação da angiotensina II, um hormônio efetor do SRAA, proporciona o aumento de ERO no rim por meio de muitas rotas, incluindo o aumento da NADPH oxidase, disfunção mitocondrial, diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico e redução das enzimas antioxidantes em mamíferos (GÓMEZ & VELARD, 2018; GORIN, 2016; LOPERENA & HARRISON, 2017; ROJAS-RIVERA et al., 2012; SOUZA et al., 2019).

Quando ocorre desequilíbrio devido ao excesso de compostos oxidantes com simultânea diminuição das defesas antioxidantes, acontece o estresse oxidativo que provoca danos aos componentes celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídios (LOPERENA & HARRISON, 2017; SOUSA et al., 2019). Diante do cenário apresentado no modelo 2R1C, analisamos o estresse oxidativo no rim esquerdo dos animais submetido à clipagem, assim como nos animais tratados com CTA, com a detecção da atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutationa peroxidase, assim como quantificamos marcadores de danos oxidativos proteicos como proteínas carboniladas e 3-nitrotirosina, além do danos lipídico através do marcador 4-hidroxinonenal.

A catalase renal não mostrou diferença na atividade entre os grupos experimentais de seis semanas, divergindo da literatura quando o trabalho de da Costa et al., (2017) indicou redução da atividade da catalase nos animais 2R1C no mesmo tempo experimental. Já nos grupos experimentais de oito semanas, observamos redução na atividade da catalase nos grupos clipado-2R1C 60d e, da mesma maneira, no grupo 2R1C + CTA 30d, diferindo ambos do grupo SHAM 60d. Não observamos diferenças na atividade da glutationa peroxidase entre os grupos experimentais de seis e oito semanas, e novamente nossos resultados diferem dos publicados anteriormente (AMARAL et al., 2019; DA COSTA et al.,2017) que indicaram redução na atividade da GPX no grupo 2R1C na sexta semana. Não encontramos trabalhos anteriores cuja análise da catalase e glutationa peroxidase tenha sido realizada no mesmo tempo experimental de oito semanas.

Não encontramos diferenças entre os grupos experimentais de 6 semanas, para quantificação das proteínas carboniladas, porém identificamos dano proteico no grupo 2R1C 60d na oitava semana experimental. Em trabalho recente da Costa el al., (2017) apresentou elevação das proteínas carboniladas em 2R1C na sexta semana experimental. Não observamos diferença significativa entre os grupos experimentais de seis e oito semanas na quantificação da 3-nitrotirosina.

O 4-HNE é um aldeído produto da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, que reage eficazmente contra proteínas das células, modificando-os, sendo cada vez mais conhecido como um mediador e marcador de disfunção celular em inúmeras doenças (GUIMARÃES-SOUZA et al., 2015; MARTINS et al., 2014; ZARKOVIC et al., 2017). Na nossa análise do dano oxidativo não identificamos diferenças na quantificação do 4-HNE entre os grupos experimentais de seis semanas. No grupo experimental de oito semanas, observamos o aumento nos níveis de 4-HNE no grupo 2R1C 60d, que indica aumento da peroxidação lipídica quando

comparado ao grupo SHAM 60d, indicando dano lipídico como consequência do estresse oxidativo ao qual esse o grupo clipado está submetido.

Esses resultados de status oxidativo indicam que os animais clipados não grupo experimental de seis semanas não apresentaram estresse oxidativo, diferente do observado nos animais clipados do grupo experimental de oito semanas, que apresentaram danos oxidativos e redução de atividade da enzima antioxidante catalase, dano proteíco e peroxidação lipídica. A Catalase é a responsável pela neutralização da H₂O₂. Embora o H₂O₂ não seja uma ERO ele é responsável por gerar o OH, que é muito deletério para membranas celulares (CAMPOS & LEME, 2018; DA COSTA, 2012). Em excesso o H₂O₂ ativa os canais TRPC6 e estimula o influxo de cálcio para as células, que levam a alteração na estrutura podocitária como hipetrofia e fusão (ILATOVSKAYA et al., 2018), que foram observadas na ultraestrutura dos rins dos animais com isquemia prolongada. Foram observadas ainda alterações histopatológicas como desorganização tubular, glomeruloesclerose, espessamento de membrana basal, injuria endotelial, presença de infiltrado inflamatório e fibrose que põem ser atribuídos também ao estresse oxidativo avançado (LERMAN et al., 2009; SU et al., 2019).

Por imunoperoxidase foi possível localizar as CTA GFP+ nos rins 15 dias após a injeção na região subcapsular. Em trabalho anterior, foi identificada a presença das células mesenquimais de medula óssea no córtex e medula renal 15 dias após tratamento do grupo clipado (LIRA et al., 2017). Tais resultados demonstram que as CTA permanecem no local da lesão, contribuindo para um ambiente adequado para a preservação renal conforme relatado no presente trabalho.

No tempo experimental de oito semanas, as CTA GFP+ foram encontradas próximas as regiões de infiltrado inflamatório. Estudos recentes (MUÑOZ et al., 2018; WEISS & DAHLKE, 2019) relatam que CTA exógenas, transplantadas diretamente no tecido, sobreviveram por até 4 meses no local após injeção, mostrando que as células podem sobreviver por um longo período, e ainda passam a desenvolver um fenótipo das células do tecido residente. Porém, as células foram injetadas em tecidos saudáveis, e não é possível prever se as células teriam a mesma sobrevivência em tecidos lesados. No trabalho de Eirin et al., (2012), as CTA foram localizadas principalmente no interstício cortical de rins suínos, quatro semanas após uma única entrega das células por via intra-renal, que aconteceu em conjunto com a revascularização renal em modelo de isquemia/reperfusão.
O trabalho de Ninichuk et al., (2006) mostra a presença das células mesenquimais obtidas de medula óssea em rins de camundongos em modelo de doença Alport, que leva à doença renal crônica até sete dias após a injeção intravenosa. As células proporcionaram redução da fibrose intersticial, contudo não houve melhora da função renal e nem retardo da progressão da doença renal crônica nesses animais.

A via de administração também é uma etapa importante para o sucesso do tratamento. A via mais utilizada é a administração intravenosa, entretanto, uma pequena fração das células transplantadas alcança o órgão alvo devido a maior quan tidade ficar retida em outros órgãos, como o pulmão por exemplo (KINOMURA et al.,2008; ORNELAS et al., 2019). No presente estudo foi feita a opção pela injeção na região subcapsular do rim esquerdo, uma via de administração direta que proporciona maior aporte de células com uma interação duradoura no órgão lesionado (ZHU et al., 2013; BEIRAL et al., 2014)

No contexto clínico, a eficácia das CTM vem sendo muito discutida na atualidade. O grupo de Saad et al., (2017) avaliou a segurança e a eficácia do uso de CTA administradas uma única vez por via intra-arterial no tratamento de quatorze pacientes com doença renal aterosclerótica e três meses após tratamento constatou melhora da oxigenação renal e fluxo sanguíneo cortical. O trabalho de, Kim et al., (2017) alerta para efeitos adversos no uso clínico das CTM e os autores relatam a experiência de um paciente com DRC que recebeu injeção intravenosa de CTA autóloga e, após uma semana, a função renal preexistente foi completamente agravada. A biopsia renal revelou fibrose intersticial grave, infiltração de células inflamatórias, e algumas células expressando marcadores de superfície de células-tronco três meses após administração de CTA.

Diversos trabalhos clínicos indicam que CTM administradas em órgãos os quais apresentam inflamação crônica bem estabelecida, como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e cardíaca, podem não ter uma ação reparadora tão eficaz, uma vez que essas células respondem constantemente ao microambiente ao qual se encontram (BOCHON et al., 2019; CHEN et al., 2010; NAM et al., 2015; SWAMINATHAN et al., 2015). Quadri et al., (2018) relatou que o rim 2R1C, com 28 dias de clipagem, apresenta inflamação e fibrose em estágios avançados. Na revisão de Denu & Hematti (2016) inúmeros trabalhos atribuem ao EO como principal causa da redução da potencialidade reparadora das CTM, em virtude de prejudicar a biologia das células, como redução da capacidade proliferativa, aumento de senescência, redução de competência imunomodulatória. Ainda o desequilíbrio no aumento das ERO e redução das defesas antioxidantes promovem um ambiente favorável para indução da diferenciação das CTM em linhagens adipogênica (DE VILLIERS et al., 2018), o que pode comprometer sua capacidade reparadora em ambientes submetidos ao estresse oxidativo. Embora tenhamos encontrado CTA no rim 30 dias após o tratamento, o rim esquerdo esteve submetido a longo tempo com escasso suprimento sanguíneo, onde foram encontrados tanto EO quanto inflamação, caracterizando esse como um ambiente que compromete a capacidade regenerativa própria das CTM e como consequência o dano tecidual não foi revertido pelo tratamento. Assim, novos estudos são necessários para investigar a frequência adequada de administração das CTA em busca da restauração estrutural do parênquima renal em tempos mais tardios de tratamento da nefropatia isquêmica.

CONCLUSÃO

No modelo de nefropatia isquêmica avaliado, o tratamento com células-tronco adiposas mostrou benefícios na mordologia renal a curto prazo, não observada em tempo tardio, apesar da permanência dessas células no tecido. Acreditamos que o estresse oxidativo, evidenciado somente no tecido com esquemia mais prolongada, possa ter dificultado a ação reparadora inerente às células-tronco, contribuindo para tais achados. Esses resultados abrem perspectivas para o aprofundamento do estudo quanto à caracterização dos mecanimos de ação das CTA nas respostas antifibrogênicas, assim como o estabelecimento do número, frequência, vias de administração e melhor momento para uso mais adequado das células-tronco mesenquimais.

REFERÊNCIAS

ABDANIPOUR A, TIRAIHI T, DELSHAD A. Trans-differentiation of the adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells expressing neurotrophins by selegiline. Iran Biomed J. 2011;15(4):113-21.

ALISON MR, ISLAM S. Attributes of adult stem cells. J Pathol. 2009;217(2):144-60.

AL-SURAIH M, GRANDE JP. Management of renal artery stenosis: What does the experimental evidence tell us? World J Cardiol. 2014;6(8):855-60.

AMARAL JH, RIZZI ES, ALVES-LOPES R, PINHEIRO LC, TOSTES RC, TANUS-SANTOS JE. Antioxidant and antihypertensive responses to oral nitrite involves activation of the Nrf2 pathway. Free Radic Biol Med. 2019; 141:261-8.

AMORIM RG, GUEDES GDS, VASCONCELOS SML, SANTOS JCF. KIDNEY Disease in Diabetes Mellitus: Cross-Linking between Hyperglycemia, Redox Imbalance and Inflammation. Arq Bras Cardiol. 2019;112(5):577-87.

AZEVEDO AA, 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 – Dissertação.

BAJEK A, GURTOWSKA N, OLKOWSKA J, KAZMIERSKI L, MAJ M, DREWA T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2016;64(6):443-54.

BAPTISTA LS, SILVA KR, BOROJEVIC R. Obesity and weight loss could alter the properties of adipose stem cells? World J Stem Cells. 2015;7(1):165-73.

BARTON M, SOROKIN A. Endothelin and the glomerulus in chronic kidney disease. Semin Nephrol. 2015;35(2):156-67.

BEHR B, KO SH, WONG VW, GURTNER GC, LONGAKER MT. Stem cells. Plast Reconstr Surg. 2010;126(4):1163-71.

BEIRAL HJ, RODRIGUES-FERREIRA C, FERNANDES AM, GONSALEZ SR, MORTARI NC, TAKIYA CM, et al. The impact of stem cells on electron fluxes, proton translocation, and ATP synthesis in kidney mitochondria after ischemia/reperfusion. Cell Transplant. 2014;23(2):207-20.

BEZERRA DEO, FEITOSA ML, ALMEIDA HM, COSTA FA, BRAGA JF, SOUZA FEA, et al. Collared pecary (Tayassu tajacu) as a new model of renal ischemic injury induced by clamping the renal artery. Acta Cir Bras. 2014;29(9):560-72.

BHARGAVA P, SCHNELLMANN RG. Mitochondrial energetics in the kidney. Nat Rev Nephrol. 2017;13(10):629-46.

BOCHON B, KOZUBSKA M, SURYGAŁA G, WITKOWSKA A, KUŹNIEWICZ R, GRZESZCZAK W, et al. Mesenchymal Stem Cells-Potential Applications in Kidney Diseases. Int J Mol Sci. 2019;20(10).

BROWN C, MCKEE C, BAKSHI S, WALKER K, HAKMAN E, HALASSY S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. J Tissue Eng Regen Med. 2019.

CAMPOS RR, OLIVEIRA-SALES EB, NISHI EE, BOIM MA, DOLNIKOFF MS, BERGAMASCHI CT. The role of oxidative stress in renovascular hypertension. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2011;38(2):144-52.

CAMPOS MTGC; LEME FOP. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. Rev. Pubvet, v.12, n.1, a10, p.1-8, Jan. 2018.

CAO J, LI X, LU X, ZHANG C, YU H, ZHAO T. Cells derived from iPSC can be immunogenic - yes or no? Protein Cell. 2014;5(1):1-3.

CESAREO R, FALCHETTI A, ATTANASIO R, TABACCO G, NACIU AM, PALERMO A. Hypovitaminosis D: Is It Time to Consider the Use of Calcifediol? Nutrients. 2019;11(5).

CHADE AR. Understanding and managing atherosclerotic renovascular disease: still a work in progress. F1000Res. 2018;7.

CHEN B, HU J, LIAO L, SUN Z, HAN Q, SONG Z, et al. Flk-1+ mesenchymal stem cells aggravate collagen-induced arthritis by up-regulating interleukin-6. Clin Exp Immunol. 2010;159(3):292-302.

CHEN Y, LIN L, TAO X, SONG Y, CUI J, WAN J. The role of podocyte damage in the etiology of ischemia-reperfusion acute kidney injury and post-injury fibrosis. BMC Nephrol. 2019;20(1):106.

CHENG J, ZHOU W, WARNER GM, KNUDSEN BE, GAROVIC VD, GRAY CE, et al. Temporal analysis of signaling pathways activated in a murine model of two-kidney, one-clip hypertension. Am J Physiol Renal Physiol. 2009;297(4):F1055-68.

CHEVALIER RL. The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction. Am J Physiol Renal Physiol. 2016;311(1): F145-61.

CIUFFI S, ZONEFRATI R, BRANDI ML. Adipose stem cells for bone tissue repair. Clin Cases Miner Bone Metab. 2017;14(2):217-26.

CLAUDIO S, NICOLA S, CLAUDIO P, STEFANO N, DINA V, ANTONIO S. When kidneys and lungs suffer together. J Nephrol. 2018.

COLELL A, FERNÁNDEZ A, FERNÁNDEZ-CHECA JC. Mitochondria, cholesterol and amyloid beta peptide: a dangerous trio in Alzheimer disease. J Bioenerg Biomembr. 2009;41(5):417-23. DA COSTA CA, OGNIBENE DT, CORDEIRO VSC, DE BEM GF, SANTOS IB, SOARES RA, et al. Effect of Euterpe oleracea Mart. Seeds Extract on Chronic Ischemic Renal Injury in Renovascular Hypertensive Rats. J Med Food. 2017;20(10):1002-10.

DA COSTA CA. Efeito do extrato de Euterpe oleracea Mart. (Açaí) sobre a disfunção endotelial, estresse oxidativo e alterações vasculares e renais associados à hipertensão renovascular dois rins, 1 clip (2R,1C) – UERJ. 2012. Tese.

DALOUL R, MORRISON AR. Approach to atherosclerotic renovascular disease: 2016. Clin Kidney J. 2016;9(5):713-21.

DAMDIMOPOULOU P, RODIN S, STENFELT S, ANTONSSON L, TRYGGVASON K, HOVATTA O. Human embryonic stem cells. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2016; 31:2-12.

DE MORAIS SDB, SHANKS J, ZUCKER IH. Integrative Physiological Aspects of Brain RAS in Hypertension. Curr Hypertens Rep. 2018;20(2):10.

DE VILLIERS D, POTGIETER M, AMBELE MA, ADAM L, DURANDT C, PEPPER MS. The Role of Reactive Oxygen Species in Adipogenic Differentiation. Adv Exp Med Biol. 2018; 1083:125-44.

DELLES C, VANHOLDER R. Chronic kidney disease. Clin Sci (Lond). 2017;131(3):225-6.

DENU RA, HEMATTI P. Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. Oxid Med Cell Longev. 2016; 2016:2989076.

DIAS I, SALVIANO Í, MENCALHA A, DE CARVALHO SN, THOLE AA, CARVALHO L,

CORTEZ E; STUMBO AC. Neonatal overfeeding impairs differentiation potential of mice subcutaneous adipose mesenchymal stem cells. Stem Cell Rev Rep. 2018;14(4):535-45.

DUANN P, LIN PH. Mitochondria Damage and Kidney Disease. Adv Exp Med Biol. 2017; 982:529-51.

DUSCHER D, BARRERA J, WONG VW, MAAN ZN, WHITTAM AJ, JANUSZYK M, et al. Stem Cells in Wound Healing: The Future of Regenerative Medicine? A Mini-Review. Gerontology. 2016;62(2):216-25.

EIRIN A, ZHU XY, KRIER JD, TANG H, JORDAN KL, GRANDE JP, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve revascularization outcomes to restore renal function in swine atherosclerotic renal artery stenosis. Stem Cells. 2012;30(5):1030-41.

_____, ZHU XY, PURANIK AS, TANG H, MCGURREN KA, VAN WIJNEN AJ, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation. Kidney Int. 2017;92(1):114-24 _____, TEXTOR SC, LERMAN LO. Novel therapeutic strategies for renovascular disease. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2019;28(4):383-9.

EL AGHA E, KRAMANN R, SCHNEIDER RK, LI X, SEEGER W, HUMPHREYS BD, et al. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. Cell Stem Cell. 2017;21(2):166-77.

ELLISON-HUGHES GM, MADEDDU P. Exploring pericyte and cardiac stem cell secretome unveils new tactics for drug discovery. Pharmacol Ther. 2017; 171:1-12.

FAN M, ZHANG J, XIN H, HE X, ZHANG X. Current Perspectives on Role of MSC in Renal Pathophysiology. Front Physiol. 2018; 9:1323.

FARRIS AB, ELLIS CL, ROGERS TE, LAWSON D, COHEN C, ROSEN S. Renal Medullary and Cortical Correlates in Fibrosis, Epithelial Mass, Microvascularity, and Microanatomy Using Whole Slide Image Analysis Morphometry. PLoS One. 2016;11(8): e0161019.

FERNANDES, MCF. Análise das interações celulares envolvidas na regeneração do rim após o transplante de células mononucleares de medula óssea em ratos com hipertensão renovascular. 2017. Tese

FERRANNINI E. Learning from glycosuria. Diabetes. 2011;60(3):695-6.

FISCHBACHER A, VON SONNTAG C, SCHMIDT TC. Hydroxyl radical yields in the Fenton process under various pH, ligand concentrations and hydrogen peroxide/Fe (II) ratios. Chemosphere. 2017; 182:738-44.

FRASER JK, ZHU M, WULUR I, ALFONSO Z. Adipose-derived stem cells. Methods Mol Biol. 2008; 449:59-67.

FUOCO, NL; MARCELINO, MY; STESSUK, T; RUIZ, MA; DEFFUNE, E; INÁCIO, JC; RIBEIRO-PAES, TR. Proposição de uma nova metodologia para isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais. 2016, v8, n. único, p. 7-14.

GARCIA CSC, GARCIA LCC, HENRIQUES JAP, ELY MR, GARCIA PMC. Adipose tissue-derived stem cell autologous grafts: a new approach to application in the treatment of burn victims and reconstructive plastic surgery. Rev. Bras. Cir. Plást.2016;31(3):417-423.

GARTNER, LP & HIATT, JL. Tratado de histologia em cores. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Elsevier, 2007.

GEWIN L, ZENT R, POZZI A. Progression of chronic kidney disease: too much cellular talk causes damage. Kidney Int. 2017;91(3):552-60.

GEWIN LS. Renal fibrosis: Primacy of the proximal tubule. Matrix Biol. 2018;68-69:248-62.

GOLDBLATT H, LYNCH J, HANZAL RF, SUMMERVILLE WW. Studies on experimental hypertension: i. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. J Exp Med. 1934;59(3):347-79.

GÓMEZ GI, VELARDE V. Boldine Improves Kidney Damage in the Goldblatt 2K1C Model Avoiding the Increase in TGF-β. Int J Mol Sci. 2018;19(7).

GORIN Y. The Kidney: An Organ in the Front Line of Oxidative Stress-Associated Pathologies. Antioxid Redox Signal. 2016;25(12):639-41.

GRAHAM LA, DOMINICZAK AF, FERRERI NR. Role of renal transporters and novel regulatory interactions in the TAL that control blood pressure. Physiol Genomics. 2017;49(5):261-76.

GRAHAMMER F. New structural insights into podocyte biology. Cell Tissue Res. 2017;369(1):5-10.

GUIMARÃES-SOUZA NK, YAMALEYEVA LM, LU B, RAMOS AC, BISHOP CE, ANDERSSON KE. Superoxide overproduction and kidney fibrosis: a new animal model. Einstein (Sao Paulo). 2015;13(1):79-88.

GURUSAMY N, ALSAYARI A, RAJASINGH S, RAJASINGH J. Adult Stem Cells for Regenerative Therapy. Prog Mol Biol Transl Sci. 2018; 160:1-22.

HAGEMANN R, SILVA VOS, FRANCO RJ, BARRETTI P, MARTIN LC. Effect of renal revascularization on the development of renal dysfunction in atherosclerotic ischemic nephropathy. J Bras Nefrol. 2014;36(4):535-41.

HALLBERG M, SUMNERS C, STECKELINGS UM, HALLBERG A. Small-molecule AT2 receptor agonists. Med Res Rev. 2018;38(2):602-24.

HASSANSHAHI A, HASSANSHAHI M, KHABBAZI S, HOSSEINI-KHAH Z, PEYMANFAR Y, GHALAMKARI S, et al. Adipose-derived stem cells for wound healing. J Cell Physiol. 2019;234(6):7903-14.

HELMERSSON-KARLQVIST J, HÖÖG HAMMARSTRÖM K, PALMBERG K, BACKMAN-JOHANSSON C. Evaluation of Nova StatStrip and FreeStyle Precision Pro blood ketone tests using 3-hydroxybutyrate doped samples. J Clin Lab Anal. 2019;33(4): e22851.

HERRERA, M.; MIROTSOU, M. Stem cells: potential and challenges for kidney repair. Am J Physiol Renal Physiol, v. 306, n. 1, p. F12-23, Jan 2014. ISSN 1522-1466.

HERRMANN SM, TEXTOR SC. Current Concepts in the Treatment of Renovascular Hypertension. Am J Hypertens. 2018;31(2):139-49.

_____, TEXTOR SC. Renovascular Hypertension. Endocrinol Metab Clin North Am. 2019;48(4):765-78.

HOLZGREVE H. [Atherosclerotic renovascular disease - medical therapy or revascularisation?]. MMW Fortschr Med. 2016;158(13):63-7.

HUIDOBRO E JP, TAGLE R, GUZMÁN AM. [Estimation of glomerular filtration rate with creatinine]. Rev Med Chil. 2018;146(3):344-50.

ILATOVSKAYA DV, BLASS G, PALYGIN O, LEVCHENKO V, PAVLOV TS, GRZYBOWSKI MN, et al. A NOX4/TRPC6 Pathway in Podocyte Calcium Regulation and Renal Damage in Diabetic Kidney Disease. J Am Soc Nephrol. 2018;29(7):1917-27.

JHA JC, BANAL C, CHOW BS, COOPER ME, JANDELEIT-DAHM K. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. Antioxid Redox Signal. 2016;25(12):657-84.

JUNQUEIRA L. C., CARNEIRO J. (2013). Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 12. ed. p.371388.

KAO MP, ANG DS, PALL A, STRUTHERS AD. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae, and therapeutic options. J Hum Hypertens. 2010;24(1):1-8.

KATTOOR AJ, POTHINENI NVK, PALAGIRI D, MEHTA JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep. 2017;19(11):42.

KEHRER JP, KLOTZ LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. Crit Rev Toxicol. 2015;45(9):765-98.

KERN S, EICHLER H, STOEVE J, KLÜTER H, BIEBACK K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells. 2006;24(5):1294-301.

KHATAMI MR. Ischemic nephropathy: more than a simple renal artery narrowing. Iran J Kidney Dis. 2013;7(2):82-100.

KIERSZENBAUM A L & TRES L. Histologia e Biologia Celular. Uma introdução à patologia. 3ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KIM JS, LEE JH, KWON O, CHO JH, CHOI JY, PARK SH, et al. Rapid deterioration of preexisting renal insufficiency after autologous mesenchymal stem cell therapy. Kidney Res Clin Pract. 2017;36(2):200-4.

KIM YJ, JEONG JH. Clinical application of adipose stem cells in plastic surgery. J Korean Med Sci. 2014;29(4):462-7.

KINOMURA M, KITAMURA S, TANABE K, ICHINOSE K, HIROKOSHI K, TAKAZAWA Y, et al. Amelioration of cisplatin-induced acute renal injury by renal progenitor-like cells derived from the adult rat kidney. Cell Transplant. 2008;17(1-2):143-58.

KITCHING AR, HUTTON HL. The Players: Cells Involved in Glomerular Disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2016;11(9):1664-74. KOCAN B, MAZIARZ A, TABARKIEWICZ J, OCHIYA T, BANAŚ-ZĄBCZYK A. Trophic Activity and Phenotype of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Background of Their Regenerative Potential. Stem Cells Int. 2017; 2017:1653254.

KOKAI LE, MARRA K, RUBIN JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. Transl Res. 2014;163(4):399-408.

KRIZ W, SHIRATO I, NAGATA M, LEHIR M, LEMLEY KV. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. Am J Physiol Renal Physiol. 2013;304(4): F333-47.

KURIEN AA, LARSEN C, RAJAPURKAR M, BONSIB SM, WALKER P. Lack of electron microscopy hinders correct renal biopsy diagnosis: A study from India. Ultrastruct Pathol. 2016;40(1):14-7.

KURIHARA H, SAKAI T. Cell biology of mesangial cells: the third cell that maintains the glomerular capillary. Anat Sci Int. 2017;92(2):173-86.

LEE HK, LIM SH, CHUNG IS, PARK Y, PARK MJ, KIM JY, et al. Preclinical efficacy and mechanisms of mesenchymal stem cells in animal models of autoimmune diseases. Immune Netw. 2014;14(2):81-8.

LERMAN LO, TEXTOR SC, GRANDE JP. Mechanisms of tissue injury in renal artery stenosis: ischemia and beyond. Prog Cardiovasc Dis. 2009;52(3):196-203.

LI N, HUA J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. Cell Mol Life Sci. 2017;74(13):2345-60.

LIPINSKI B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. Oxid Med Cell Longev. 2011; 2011:809696.

LIRA R, OLIVEIRA M, MARTINS M, SILVA C, CARVALHO S, STUMBO AC, et al. Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves renal function and Na++K+-ATPase activity in rats with renovascular hypertension. Cell Tissue Res. 2017.

LIRA, RC. Transplante de Células-Tronco Mesenquimais em ratos com hipertensão renovascular -Tese de doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental. UERJ - 2017.Tese.

LIU X, MAO Y, HE X, WANG M, GAN L. Ultrastructural pathological features of unilateral renal artery stenosis in the rats. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(5):4807-14.

LOPERENA R, HARRISON DG. Oxidative Stress and Hypertensive Diseases. Med Clin North Am. 2017;101(1):169-93.

LÓPEZ JI, LARRINAGA G, KURODA N, ANGULO JC. The normal and pathologic renal medulla: a comprehensive overview. Pathol Res Pract. 2015;211(4):271-80.

LUPU AN, MAXWELL MH, KAUFMAN JJ, WHITE FN. Experimental unilateral renal artery constriction in the dog. Circ Res. 1972;30(5):567-74. MARCHEQUE J, BUSSOLATI B, CSETE M, PERIN L. Concise Reviews: Stem Cells and Kidney Regeneration: An Update. Stem Cells Transl Med. 2019;8(1):82-92.

MARQUES RG, MORALES MM, PETROIANU A. Brazilian law for scientific use of animals. Acta Cir Bras. 2009;24(1):69-74.

MARTINI AG, DANSER AHJ. Juxtaglomerular Cell Phenotypic Plasticity. High Blood Press Cardiovasc Prev. 2017;24(3):231-42.

MARTINS MA, MOSS MB, MENDES IK, ÁGUILA MB, MANDARIM-DE-LACERDA CA, BRUNINI TM, et al. Role of dietary fish oil on nitric oxide synthase activity and oxidative status in mice red blood cells. Food Funct. 2014;5(12):3208-15.

MASAJTIS-ZAGAJEWSKA A, NOWICKI M. New markers of urinary tract infection. Clin Chim Acta. 2017; 471:286-91.

MATAI I, KAUR G, SEYEDSALEHI A, MCCLINTON A, LAURENCIN CT. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. Biomaterials. 2020; 226:119536.

MCCORMICK JA, ELLISON DH. Distal convoluted tubule. Compr Physiol. 2015;5(1):45-98.

MELLO DB, RAMOS IP, MESQUITA FC, BRASIL GV, ROCHA NN, TAKIYA CM, et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Protect Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* from Cardiac Damage through Modulation of Anti-parasite Immunity. Plos Negl Trop Dis. 2015;9(8):e0003945.

MELO MR, GASPARINI S, SPERETTA GF, SILVA EF, RODRIGUES PEDRINO G, MENANI JV, et al. Importance of the commissural nucleus of the solitary tract in renovascular hypertension. Hypertens Res. 2019;42(5):587-97.

MÉNARD C, DULONG J, ROULOIS D, HÉBRAUD B, VERDIÈRE L, PANGAULT C, et al. Integrated Transcriptomic, Phenotypic, and Functional Study Reveals Tissue-Specific Immune Properties of Mesenchymal Stromal Cells. Stem Cells. 2019.

MENG XM, REN GL, GAO L, YANG Q, LI HD, WU WF, et al. NADPH oxidase 4 promotes cisplatin-induced acute kidney injury via ROS-mediated programmed cell death and inflammation. Lab Invest. 2018;98(1):63-78.

MIRZAEI H, SAHEBKAR A, SICHANI LS, MORIDIKIA A, NAZARI S, SADRI NAHAND J, et al. Therapeutic application of multipotent stem cells. J Cell Physiol. 2018;233(4):2815-23.

MISRA S, OLIVER NS. Utility of ketone measurement in the prevention, diagnosis and management of diabetic ketoacidosis. Diabet Med. 2015;32(1):14-23.

MOHAMMADI-MAHDIABADI-HASANI MH, NABIUNI M, PARIVAR K, YARI S, SAHEBI AR, MIYAN J. The Effects of Embryonic Cerebrospinal Fluid on The Viability and Neuronal Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Wistar Rats. Cell J. 2020;22(2):245-52.

MORTENSEN MB, NILSSON L, LARSEN TG, ESPESETH E, BEK M, BJØRKLUND MM, et al. Prior renovascular hypertension does not predispose to atherosclerosis in mice. Atherosclerosis. 2016; 249:157-63.

MOUNT DB. Thick ascending limb of the loop of Henle. Clin J Am Soc Nephrol. 2014;9(11):1974-86.

MUÑOZ MF, ARGÜELLES S, GUZMAN-CHOZAS M, GUILLÉN-SANZ R, FRANCO JM, PINTOR-TORO JA, et al. Cell tracking, survival, and differentiation capacity of adipose-derived stem cells after engraftment in rat tissue. J Cell Physiol. 2018;233(10):6317-28.

MUSHAHARY D, SPITTLER A, KASPER C, WEBER V, CHARWAT V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. Cytometry A. 2018;93(1):19-31.

NAM YS, KIM N, IM KI, LIM JY, LEE ES, CHO SG. Negative impact of bone-marrowderived mesenchymal stem cells on dextran sulfate sodium-induced colitis. World J Gastroenterol. 2015;21(7):2030-9.

NDISANG JF. Glomerular Endothelium and its Impact on Glomerular Filtration Barrier in Diabetes: Are the Gaps Still Illusive? Curr Med Chem. 2018;25(13):1525-9.

NEUHUBER B, SWANGER SA, HOWARD L, MACKAY A, FISCHER I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. Exp Hematol. 2008;36(9):1176-85.

NINICHUK V, GROSS O, SEGERER S, HOFFMANN R, RADOMSKA E, BUCHSTALLER A, et al. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3deficient mice. Kidney Int. 2006;70(1):121-9.

NISHI EE, BERGAMASCHI CT, CAMPOS RR. The crosstalk between the kidney and the central nervous system: the role of renal nerves in blood pressure regulation. Exp Physiol. 2015;100(5):479-84.

NISHIMURA H. Renin-angiotensin system in vertebrates: phylogenetic view of structure and function. Anat Sci Int. 2017;92(2):215-47.

OKANO H, YAMANAKA S. iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. Mol Brain. 2014; 7:22.

OLIVEIRA M, LIRA R, FREIRE T, LUNA C, MARTINS M, ALMEIDA A, et al. Bone marrow mononuclear cell transplantation rescues the glomerular filtration barrier and epithelial cellular junctions in a renovascular hypertension model. Exp Physiol. 2019;104(5):740-54.

OLIVEIRA-SALES EB, VARELA VA, BERGAMASCHI CT, CAMPOS RR, BOIM MA. Effects of mesenchymal stem cells in renovascular hypertension. Exp Physiol. 2015;100(5):491-5.

_____, MAQUIGUSSA E, SEMEDO P, PEREIRA LG, FERREIRA VM, CÂMARA NO, et al. Mesenchymal stem cells (MSC) prevented the progression of renovascular hypertension, improved renal function and architecture. PLoS One. 2013;8(11):e78464.

_____, BOIM MA. Mesenchymal stem cells and chronic renal artery stenosis. Am J Physiol Renal Physiol. 2016;310(1):F6-9.

OLSON KR, GAO Y, DELEON ER, ARIF M, ARIF F, ARORA N, et al. Catalase as a sulfide-sulfur oxido-reductase: An ancient (and modern?) regulator of reactive sulfur species (RSS). Redox Biol. 2017; 12:325-39

ORNELLAS FM, RAMALHO RJ, FANELLI C, GARNICA MR, MALHEIROS DMAC, MARTINI SV, et al. Mesenchymal Stromal Cells Induce Podocyte Protection in the Puromycin Injury Model. Sci Rep. 2019;9(1):19604.

PEIRED AJ, SISTI A, ROMAGNANI P. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Kidney Disease: A Review of Clinical Evidence. Stem Cells Int. 2016; 2016:4798639.

PEREIRA PG, RABELO K, DA SILVA JFR, CIAMBARELLA BT, ARGENTO JGC, NASCIMENTO ALR, et al. Aliskiren improves renal morphophysiology and inflammation in Wistar rats with 2K1C renovascular hypertension. Histol Histopathol. 2019:18173.

PINHEIRO D, DIAS I, RIBEIRO SILVA K, STUMBO AC, THOLE A, CORTEZ E, et al. Mechanisms Underlying Cell Therapy in Liver Fibrosis: An Overview. Cells. 2019;8(11).

POLLAK MR, QUAGGIN SE, HOENIG MP, DWORKIN LD. The glomerulus: the sphere of influence. Clin J Am Soc Nephrol. 2014;9(8):1461-9.

QUADRI SS, CULVER S, SIRAGY HM. Prorenin receptor mediates inflammation in renal ischemia. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2018;45(2):133-9.

RAJABZADEH N, FATHI E, FARAHZADI R. Stem cell-based regenerative medicine. Stem Cell Investig. 2019; 6:19.

RAJARAM RD, DISSARD R, FAIVRE A, INO F, DELITSIKOU V, JAQUET V, et al. Tubular NOX4 expression decreases in chronic kidney disease but does not modify fibrosis evolution. Redox Biol. 2019;26: 101234. REISER J, ALTINTAS MM. Podocytes. F1000Res. 2016;5.

ROJAS-RIVERA J, ORTIZ A, EGIDO J. Antioxidants in kidney diseases: the impact of bardoxolone methyl. Int J Nephrol. 2012; 2012:321714.4 ROMAGNANI P, REMUZZI G, GLASSOCK R, LEVIN A, JAGER KJ, TONELLI M, et al. Chronic kidney disease. Nat Rev Dis Primers. 2017; 3:17088.

ROMITO A, COBELLIS G. Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions. Stem Cells Int. 2016; 2016:9451492.

ROSALES-CORRAL SA, LOPEZ-ARMAS G, CRUZ-RAMOS J, MELNIKOV VG, TAN DX, MANCHESTER LC, et al. Alterations in Lipid Levels of Mitochondrial Membranes Induced by Amyloid- β : A Protective Role of Melatonin. Int J Alzheimers Dis. 2012; 2012:459806.

ROSS M. H. (2016). Histologia: texto e atlas / Michael H. Ross, Wojciech Pawlina. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 7 ed. p. 702-741.

ROTA C, MORIGI M, IMBERTI B. Stem Cell Therapies in Kidney Diseases: Progress and Challenges. Int J Mol Sci. 2019;20(11).

SAAD A, DIETZ AB, HERRMANN SMS, HICKSON LJ, GLOCKNER JF, MCKUSICK MA, et al. Autologous Mesenchymal Stem Cells Increase Cortical Perfusion in Renovascular Disease. J Am Soc Nephrol. 2017;28(9):2777-85.

_____, HERRMANN SM, TEXTOR SC. Chronic renal ischemia in humans: can cell therapy repair the kidney in occlusive renovascular disease? Physiology (Bethesda). 2015;30(3):175-82.

SALAME M, PADULLA GA, MURADÁS RR, MACHADO G, BRAUN SK, SANTOS KRD, et al. Nefropatia isquêmica. Jornal Vascular Brasileiro. 2012; 11:310-6.

SCHERBERICH A, DI MAGGIO ND, MCNAGNY KM. A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue. World J Stem Cells. 2013;5(1):1-8.

SCHOEPE R, MCQUILLAN S, VALSAN D, TEEHAN G. Atherosclerotic Renal Artery Stenosis. Adv Exp Med Biol. 2017; 956:209-13.

SCOTT RP, QUAGGIN SE. Review series: The cell biology of renal filtration. J Cell Biol. 2015;209(2):199-210.

SEKI G, NAKAMURA M, SUZUKI M, SATOH N, HORITA S. Species differences in regulation of renal proximal tubule transport by certain molecules. World J Nephrol. 2015;4(2):307-12.

SHEASHAA H, LOTFY A, ELHUSSEINI F, AZIZ AA, BAIOMY A, AWAD S, et al. Protective effect of adipose-derived mesenchymal stem cells against acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion in Sprague-Dawley rats. Exp Ther Med. 2016;11(5):1573-80. SHEYKHHASAN M, WONG JKL, SEIFALIAN AM. Human Adipose-Derived Stem Cells with Great Therapeutic Potential. Curr Stem Cell Res Ther. 2019;14(7):532-48. SIES H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. Redox Biol. 2015; 4:180-3.

SINGHAL SS, SINGH SP, SINGHAL P, HORNE D, SINGHAL J, AWASTHI S. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. Toxicol Appl Pharmacol. 2015;289(3):361-70.

SOBHANI A, KHANLARKHANI N, BAAZM M, MOHAMMADZADEH F, NAJAFI A, MEHDINEJADIANI S, et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. Acta Med Iran. 2017;55(1):6-23.

SONG Y, PENG C, LV S, CHENG J, LIU S, WEN Q, et al. Adipose-derived stem cells ameliorate renal interstitial fibrosis through inhibition of EMT and inflammatory response via TGF- β 1 signaling pathway. Int Immunopharmacol. 2017; 44:115-22.

SOUSA LE, FAVERO IFD, BEZERRA FS, SOUZA ABF, ALZAMORA AC. Environmental Enrichment Promotes Antioxidant Effect in the Ventrolateral Medulla and Kidney of Renovascular Hypertensive Rats. Arq Bras Cardiol. 2019;113(5):905-12.

SPARKS MA, CROWLEY SD, GURLEY SB, MIROTSOU M, COFFMAN TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. Compr Physiol. 2014;4(3):1201-28.

STONESIFER C, COREY S, GHANEKAR S, DIAMANDIS Z, ACOSTA SA, BORLONGAN CV. Stem cell therapy for abrogating stroke-induced neuroinflammation and relevant secondary cell death mechanisms. Prog Neurobiol. 2017; 158:94-131.

SU H, WAN C, SONG A, QIU Y, XIONG W, ZHANG C. Oxidative Stress and Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies. Adv Exp Med Biol. 2019; 1165:585-604.

SUBRAMANYA AR, ELLISON DH. Distal convoluted tubule. Clin J Am Soc Nephrol. 2014;9(12):2147-63.

SUZUKI E, FUJITA D, TAKAHASHI M, OBA S, NISHIMATSU H. Adult stem cells as a tool for kidney regeneration. World J Nephrol. 2016;5(1):43-52.

SWAMINATHAN M, STAFFORD-SMITH M, CHERTOW GM, WARNOCK DG, PARAGAMIAN V, BRENNER RM, et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of AKI after Cardiac Surgery. J Am Soc Nephrol. 2018;29(1):260-7.

TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126(4):663-76

_____, YAMANAKA S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. Development. 2013;140(12):2457-61.

THONG T, FORTÉ CA, HILL EM, COLACINO JA. Environmental exposures, stem cells, and cancer. Pharmacol Ther. 2019;107398.

TOGLIATTO G, LOMBARDO G, Brizzi MF. The Future Challenge of Reactive Oxygen Species (ROS) in Hypertension: From Bench to Bed Side. Int J Mol Sci. 2017;18(9).

TORRES CRIGNA A, DANIELE C, GAMEZ C, MEDINA BALBUENA S, PASTENE DO, NARDOZI D, et al. Stem/Stromal Cells for Treatment of Kidney Injuries With Focus on Preclinical Models. Front Med (Lausanne). 2018; 5:179.

TOUYZ RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? Hypertension. 2004;44(3):248-52.

TWEEDELL KS. The Adaptability of Somatic Stem Cells: A Review. J Stem Cells Regen Med. 2017;13(1):3-13.

UDE CC, MISKON A, IDRUS RBH, ABU BAKAR MB. Application of stem cells in tissue engineering for defense medicine. Mil Med Res. 2018;5(1):7.

VASSALLO D, KALRA PA. Atherosclerotic renovascular disease - epidemiology, treatment and current challenges. Postepy Kardiol Interwencyjnej. 2017;13(3):191-201.

VILLANUEVA S, GONZÁLEZ F, LORCA E, TAPIA A, LÓPEZ VG, STRODTHOFF R, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for treating chronic kidney disease: A pilot study assessing safety and clinical feasibility. Kidney Res Clin Pract. 2019;38(2):176-85.

VIZOSO FJ, EIRO N, COSTA L, ESPARZA P, LANDIN M, DIAZ-RODRIGUEZ P, et al. Mesenchymal Stem Cells in Homeostasis and Systemic Diseases: Hypothesis, Evidences, and Therapeutic Opportunities. Int J Mol Sci. 2019;20(15).

WAGNER W, WEIN F, SECKINGER A, FRANKHAUSER M, WIRKNER U, KRAUSE U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol. 2005;33(11):1402-16.

WAN C, SU H, ZHANG C. Role of NADPH Oxidase in Metabolic Disease-Related Renal Injury: An Update. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016: 7813072.

WAN C, SU H, ZHANG C. Role of NADPH Oxidase in Metabolic Disease-Related Renal Injury: An Update. Oxid Med Cell Longev. 2016; 2016;7813072.

WANG F, LU X, PENG K, DU Y, ZHOU SF, ZHANG A, et al. Prostaglandin Eprostanoid4 receptor mediates angiotensin II-induced (pro)renin receptor expression in the rat renal medulla. Hypertension. 2014;64(2):369-77.

WANG X, GARRETT MR. Nephron number, hypertension, and CKD: physiological and genetic insight from humans and animal models. Physiol Genomics. 2017;49(3):180-92.

WANG Y, DEL BORGO M, LEE HW, BARALDI D, HIRMIZ B, GASPARI TA, et al. Anti-fibrotic Potential of AT. Front Pharmacol. 2017; 8:564.

_____, NIU M, YIN S, ZHANG F, SHI R. Nephroprotective effects of nebivolol in 2K1C rats through regulation of the kidney ROS-ADMA-NO pathway. Pharmacol Rep. 2018;70(5):917-29.

WANG Z, SUN D. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A New Tool for the Treatment of Renal Fibrosis. Stem Cells Dev. 2018;27(20):1406-11.

_____, WANG S, ZHAO J, YU C, HU Y, TU Y, et al. Naringenin Ameliorates Renovascular Hypertensive Renal Damage by Normalizing the Balance of Renin-Angiotensin System Components in Rats. Int J Med Sci. 2019;16(5):644-53.

WEHR NB, LEVINE RL. Quantification of protein carbonylation. Methods Mol Biol. 2013; 965:265-81.

WEISS ARR, DAHLKE MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. Front Immunol. 2019; 10:1191.

WESSELY O, CERQUEIRA DM, TRAN U, KUMAR V, HASSEY JM, ROMAKER D. The bigger the better: determining nephron size in kidney. Pediatr Nephrol. 2014;29(4):525-30.

YE L, MAO W. Metabonomic biomarkers for risk factors of chronic kidney disease. Int Urol Nephrol. 2016;48(4):547-52.

ZACCHIA M, CAPOLONGO G, RINALDI L, CAPASSO G. The importance of the thick ascending limb of Henle's loop in renal physiology and pathophysiology. Int J Nephrol Renovasc Dis. 2018; 11:81-92.

ZAKRZEWSKI W, DOBRZYŃSKI M, SZYMONOWICZ M, RYBAK Z. Stem cells: past, present, and future. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):68.44.

ZARKOVIC K, JAKOVCEVIC A, ZARKOVIC N. Contribution of the HNEimmunohistochemistry to modern pathological concepts of major human diseases. Free Radic Biol Med. 2017;111: 110-26.

ZHANG LH, ZHU XY, EIRIN A, Nargesi AA, Woollard JR, Santelli A, et al. Early podocyte injury and elevated levels of urinary podocyte-derived extracellular vesicles in swine with metabolic syndrome: role of podocyte mitochondria. Am J Physiol Renal Physiol. 2019;317(7): F12-F22.

ZHANG Y, LUO X, ZHOU Y, WU H, CHEN J, WANG Y, et al. 2K1C-activated Angiotensin II (Ang II) exacerbates vascular damage in a rat model of arthritis through the ATR/ERK1/2 signaling pathway. Inflamm Res. 2017;66(10):881-90. ZHANG ZH, CHEN H, VAZIRI ND, MAO JR, ZHANG L, BAI X, et al. Metabolomic Signatures of Chronic Kidney Disease of Diverse Etiologies in the Rats and Humans. J Proteome Res. 2016;15(10):3802-12.

ZHAO JH. Mesangial Cells and Renal Fibrosis. Adv Exp Med Biol. 2019; 1165:165-94.

ZHAO W, CHEN SS, CHEN Y, AHOKAS RA, SUN Y. Kidney fibrosis in hypertensive rats: role of oxidative stress. Am J Nephrol. 2008;28(4):548-54. ZHONG, J.; YANG, H. C.; FOGO, A. B. A perspective on chronic kidney disease progression. Am J Physiol Renal Physiol, v. 312, n. 3, p. F375-F384, Mar 2017. ISSN 1522-1466.

ZHU XY, LERMAN A, LERMAN LO. Concise review: mesenchymal stem cell treatment for ischemic kidney disease. Stem Cells. 2013;31(9):1731-6.

ZHUANG Q, MA R, YIN Y, LAN T, YU M, MING Y. Mesenchymal Stem Cells in Renal Fibrosis: The Flame of Cytotherapy. Stem Cells Int. 2019; 2019:8387350.

ZOJA C, GARCIA PB, ROTA C, CONTI S, GAGLIARDINI E, CORNA D, et al. Mesenchymal stem cell therapy promotes renal repair by limiting glomerular podocyte and progenitor cell dysfunction in adriamycin-induced nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol. 2012;303(9): F1370-81.

ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001;7(2):211-28.

ZUTTION MSSR, WENCESLAU CV, LEMOS PA, TAKIMURA C, KERKIS I. Célulastronco de tecido adiposo e a importância da padronização de um modelo animal para experimentação pré-clínica. Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva. 2013; 21:281-7.

ANEXO – Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da estrutura e função renal de ratos com nefropatia isquêmica após transplante de células mesenquimais de tecido adiposo", registrada com o nº 010/2017, sob a responsabilidade de Ana Carolina Stumbo Machado - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 31/01/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigencia da autorização	31/01/2021
Espécie/linhagem/raca	Rato Wistar
Nº de animais	46
Peso/Idade	300 g / 60 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 31 de Janeiro de 2017.

.CAL

Prof. Dr. Alex C. Manhães Coordenador CEUA/IBRAG/UERJ

Batrieia Grisloa

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa Vice-Coordenadora CEUA/IBRAG/UERJ

http://www.biologiauerj.com.br/comite-de-etica ceua.ibrag@yahoo.com.br