

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA - DISCIPLINA DE NEFROLOGIA**

**ESTUDOS DOS MECANISMOS RENOPROTETORES DAS CÉLULAS-TRONCO  
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE  
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

**CASSIANO DONIZETTI DE OLIVEIRA**

São Paulo

2014

CASSIANO DONIZETTI DE OLIVEIRA

ESTUDOS DOS MECANISMOS RENOPROTETORES DAS CÉLULAS-TRONCO  
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE  
DOENÇA RENAL CRÔNICA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de medicina para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento Medicina – Disciplina de Nefrologia

**Orientador:**

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

**Co-orientador:**

Prof. Dr. Alvaro Pacheco e Silva-Filho

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Donizetti-Oliveira, Cassiano

“ESTUDOS DOS MECANISMOS RENOPROTETORES DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇA RENAL CRÔNICA”, Cassiano Donizetti de Oliveira/São Paulo, 2014.

x; 84 f

Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Nefrologia.

Título em Inglês: “Role of adipose tissue-derived stem cells in the progression of chronic renal disease”.

Orientador: Câmara, Niels Olsen Saraiva.

1. Células-tronco Mesenquimais; 2. Lesão Renal aguda / Doença Renal Crônica  
3. Inflamação, 4. Fibrose.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA - DISCIPLINA DE NEFROLOGIA**

**Chefe do Departamento:** Prof. Dr. Álvaro Nagib Attalah

**Chefe da Disciplina:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gianna Mastroianni Kirsztajn

**Coordenadora da Pós-graduação:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Aparecida Boim

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**Nome:** Donizetti-Oliveira, Cassiano

**Título:** “ESTUDOS DOS MECANISMOS RENOPROTETORES DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇA RENAL CRÔNICA”.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de medicina para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Aprovado em:** 18/06/2014

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aparecida Emiko Hirata

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia da Conceição Andrade

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regiane Aparecida Cavinato

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Maria Avancini Costa Malheiros

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese à minha mãe, **Sônia Ap. Ribeiro de Oliveira**, que apesar das dificuldades e do sacrifício nunca duvidou da realização de meus Sonhos, estando sempre Orando pelos meus passos. À minha noiva, **Tatiana Rodrigues dos Santos**, pela paciência, compreensão, apoio e carinho. Aos meus avós, **Tereza Fiore Ribeiro** e **Luiz Indalécio Ribeiro**, e toda minha família (tios, tias, primas e primos), sempre presentes em minha vida, cujo amor e apoio nunca me deixaram faltar.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao **Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara**, pela orientação, pela paciência, pela extrema confiança depositada em mim durante todo o desenvolvimento do Doutorado, pelo respeito e exemplo de dedicação e amor à Ciência, possibilitando meu aprendizado e crescimento intelectual e pessoal.

Ao **Prof. Dr. Alvaro Pacheco e Silva Filho**, pela co-orientação, confiança e por disponibilizar toda a estrutura do laboratório de Imunologia Clínica e Experimental - LICE para a execução desse trabalho.

Ao **Sr. Marcos Antônio Cenedeze**, pela grande amizade, pela dedicação, pelos conselhos, pelas dicas e pelo grande exemplo de profissional e pessoa que é para nós no laboratório.

Ao **Dr. Danilo Candido de Almeida e Marina Burgos da Silva**, pela amizade, dedicação e pela disposição em ajudar sempre.

À **Dr<sup>a</sup>. Patrícia Semedo**, pela co-orientação inicial, possibilitando meu crescimento intelectual e pessoal.

Ao **Rafael Luiz Pereira e Raphael José Ferreira Felizardo**, pela amizade, ajuda nas técnicas laboratoriais, as quais foram cruciais para a realização desse trabalho e também por proporcionar grandes momentos de descontração.

À **Clarice Silvia Taemi Origassa, Cristhiane Favero de Aguiar, Priscilla Barbosa Costa, Angela Castoldi, Débora Tavares e Tamiris Borges da Silva** pela amizade, ajuda na execução de experimentos, pelo aprendizado e pela convivência no laboratório e no dia a dia.

A todos os amigos de laboratório ou pessoal que participaram indiretamente desse trabalho e proporcionaram apoio e incentivo constante, **Ana Paula**,

**Dênis, Eliana, Glória, Michel, Milton, Vanessa, Mariane, Reinaldo, Felipe, Ênio, Tércio e Matheus.**

Aos demais funcionários da disciplina de Nefrologia – UNIFESP, em especial:

**Dona Eurides, Mauro, Alexandre, Maicon, Priscila, Paulo e Pablo.**

À **Universidade Federal de São Paulo** e ao **Departamento de Medicina**

- **Disciplina de Nefrologia**, por possibilitar a realização do curso de pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - **FAPESP (2011/22568-3)**, pela concessão da bolsa de Doutorado-Direto e pela **FAPESP (2007/07139-3; 2009/13251-6)**, **RNCTC** e **CNPq/DECIT/MS** por disponibilizar apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

## **EPÍGRAFE**

*“Não é o conhecimento, mas o ato de aprender, não a posse, mas o ato de chegar lá que concede a maior satisfação.”*

**Carl Friedrich Gauss**

## SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>i</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>iv</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>v</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
Resumo em Língua Portuguesa .....	<b>vii</b>
Resumo em Língua Inglesa .....	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Lesão Renal Aguda (LRA) .....	<b>1</b>
1.2. Lesão renal Aguda e Doença Renal Crônica.....	<b>3</b>
1.2.1 Perda de Néfrons e hipertrofia glomerular:.....	<b>6</b>
1.2.2 Inflamação intersticial: .....	<b>7</b>
1.2.3 Fibrose:.....	<b>8</b>
1.2.4 Disfunção no reparo tecidual .....	<b>10</b>
1.2.5 Lesão endotelial e rarefação vascular:.....	<b>11</b>
1.3 Nefrites túbulos-intersticiais (NTI).....	<b>12</b>
1.4. Células-Troco Mesenquimais derivadas do tecido adiposo.....	<b>14</b>
1.4.1 Células-tronco Mesenquimais e Inflamação.....	<b>14</b>
1.4.2 Células-tronco Mesenquimais e Angiogênese.....	<b>15</b>
1.4.3 Células-tronco Mesenquimais e a Estimulação de células progenitoras:	<b>16</b>
1.4.4 Células-tronco Mesenquimais e Apoptose: .....	<b>16</b>
1.4.5 Células-tronco Mesenquimais e Estresse Oxidativo:.....	<b>16</b>
1.4.6 Células-tronco Mesenquimais e Fibrose:.....	<b>17</b>
<b>2. OJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1.Gerais:.....	<b>21</b>
2.2.Específicos:.....	<b>21</b>
<b>3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>22</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1. Abordagem experimental geral do projeto: .....	<b>23</b>
4.2. Isolamento de célula-tronco derivado de tecido adiposo (CTAd).....	<b>23</b>
4.3. Imunofenotipagem das CTAds.....	<b>24</b>
4.4. Diferenciação das CTAds.....	<b>24</b>
4.5. Modelo experimental:.....	<b>24</b>
4.5.1. Lesão de isquemia e reperfusão: .....	<b>24</b>
4.5.2. Modelo de nefrite túbulo-intersticial: .....	<b>25</b>

---

4.6. Protocolo experimental da IR:.....	25
4.7. Protocolo experimental NTI:.....	27
4.8. Avaliação da função renal: .....	27
4.8.1. Dosagem de Creatinina Sérica: .....	27
4.8.2 Dosagem de Uréia Sérica:.....	28
4.9. Análise Morfológica:.....	28
4.10. Análise dos transcritos gênicos: .....	28
4.11. Extração e purificação de RNA total - método TRizol®:.....	29
4.12. Síntese do DNA complementar (cDNA):.....	30
4.13. Reação de PCR em tempo real:.....	30
4.14. Bioplex:.....	32
4.15. Imunoistoquímica:.....	32
4.16. Análise estatística: .....	33
<b>5. RESULTADOS: .....</b>	<b>35</b>
5.1. Isolamento e caracterização das CTAds .....	35
5.2. Modelo de IR.....	37
5.2.1. Tratamento com CTAd leva a uma imunomodulação tecidual e sistêmica .....	37
5.2.2. CTAds interrompe a progressão da fibrose decorrente de isquemia severa .....	43
5.2.3. Imunomodulação da inflamação pelas CTAds.....	48
5.2.4. Efeito protetor das CTAds contra Hipóxia Crônica.....	50
5.2.5. Reversão da fibrose renal após tratamento com CTAds.....	52
5.3. Modelo de NTI.....	56
5.3.1 Tratamento com CTAd em modelo de nefrite túbulo-intersticial:..	56
<b>6. DISCUSSÃO:.....</b>	<b>60</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>79</b>
9.1 Produção Científica .....	79
9.2 Prêmios .....	84

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1.** Alterações no túbulo renal e no ambiente peritubular na progressão da LRA para DRC

**Figura 2.** TEM e formação de fibrose

**Figura 3.** Mecanismo associado ao efeito anti-fibrótico das CTMs na progressão da DRC

**Figura 4.** Delineamento experimental do modelo proposto para estudo dos mecanismos renoprotetores das CTAds.

**Figura 5.** Caracterização morfológica, imunofenotípica e por diferenciação das CTAds derivadas de camundongos C57BL/6

**Figura 6.** Parâmetros funcionais renais após 24 horas de IR.

**Figura 7.** Análise histomorfométrica do tecido renal após 24h de isquemia unilateral.

**Figura 8.** Efeito imunomodulatório no tecido renal após a administração de CTAds com 24h de isquemia unilateral.

**Figura 9.** Efeito sistêmico na modulação de citocinas após a administração de CTAds com 24h de isquemia unilateral.

**Figura 10.** Análise da possível presença de CTAd no tecido renal após 24h de isquemia unilateral.

**Figura 11.** Visualização e análise funcional dos rins de animais tratados e não tratados com CTAds após 6 semanas de isquemia unilateral.

**Figura 12.** Análise de Fibrose por coloração de Tricômio de Masson e Picro Sírius em animais tratados e não tratados com CTAds após 6 semanas de isquemia unilateral.

**Figura 13.** Expressão de mRNA e moléculas pró-fibróticas em tecido renal de animais tratados e não tratados com CTAds com 6 semanas após a reperfusão

**Figura 14.** Expressão de citocinas e moléculas renoprotetoras em tecido renal de animais tratados ou não com CTAds e sacrificados 6 semanas após a reperfusão.

**Figura 15.** Expressão global de citocinas em soro renal dos animais tratados e não tratados com CTAds e sacrificados com 6 semanas após a reperfusão.

**Figura 16.** Imuno-histoquímica de Hypoxyprobe e análise de moléculas angiogênicas em tecido renal de animais tratados e não tratados com CTAds com 6 semanas após a reperfusão.

**Figura 17.** Efeitos da administração de CTAds na 6<sup>a</sup> semana após IR, e sacrifício após 10 semanas.

**Figura 18.** Expressão de citocinas em tecido renal dos animais tratados e não tratados com CTAds com 10 semanas após a reperfusão.

**Figura 19.** Níveis de Creatinina e Uréia Sérica após tratamento com ração enriquecida com adenina e CTAds.

**Figura 20.** Análise de Fibrose por coloração de Picro Sírius no modelo de NTI.

**Figura 21.** Expressão de moléculas Fibróticas em tecido renal dos animais tratados ou não com CTAd no modelo de NTI.

**Figura 22.** Efeito imunomodulatório no tecido renal da administração de CTAd no modelo de NTI.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Tabela representativa dos genes e seus correspondentes iniciadores usados para análise de expressão gênica.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

---

<b>APRT</b>	Adenina-fosforibosiltransferase
<b>BMP -7</b>	Proteína morfogenética tipo 7
<b>CCR2</b>	Receptor de quimiocina tipo 2
<b>CD:</b>	Antígenos de diferenciação (“Cluster of differentiation”)
<b>CFU-F:</b>	Unidades formadoras de colônias – Fibroblastos
<b>Col</b>	Colágeno
<b>CTAd:</b>	Célula-tronco mesenquimal derivada do tecido adiposo
<b>CTGF:</b>	Fator de crescimento de tecido conjuntivo
<b>CTMs:</b>	Células-tronco mesenquimais
<b>DAB:</b>	3,3-Diaminobenzidina tetrahidrocloro
<b>DHA</b>	Diidroxadenina
<b>DMEM:</b>	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
<b>DRC:</b>	Doença renal crônica
<b>EDTA:</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EPO:</b>	Eritropoietina
<b>EROs:</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ERNs</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>FSP-1</b>	Proteína específica de fibroblastos-1
<b>FTG</b>	<i>Feedback</i> túbulo-glomerular
<b>HGF:</b>	Fator de crescimento de hepatócitos
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitário humano
<b>HO:</b>	Heme oxigenase
<b>HPRT:</b>	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adesão intercelular-1
<b>IDO:</b>	Indolamina 2, 3 deoxigenase
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IL:</b>	Interleucina
<b>iNOS:</b>	Óxido nítrico sintetase induzível
<b>IR:</b>	Lesão de isquemia e reperfusão
<b>IRA:</b>	Insuficiência Renal Aguda
<b>IR 24h:</b>	Lesão de isquemia e reperfusão unilateral grupo 24h;

---

<b>KC</b>	Quimiocina derivada de queratinócitos
<b>LRA:</b>	Lesão Renal Aguda
<b>MCP-1:</b>	Proteína quimiotática de monócitos 1
<b>MMP</b>	Matriz Metaloproteinase
<b>NF-κB:</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NK:</b>	Células <i>natural killer</i>
<b>NO:</b>	Óxido nítrico
<b>NTA:</b>	Necrose tubular aguda
<b>NTI</b>	Nefrite túbulo-intersticial
<b>Nx</b>	Nefrectomia
<b>PBS:</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PCNA:</b>	Antígeno nuclear de proliferação celular
<b>PGE:</b>	Prostaglandina E
<b>RANTES:</b>	Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
<b>SFB:</b>	Soro fetal bovino
<b>SRY</b>	Região Y determinante do sexo
<b>TEM</b>	Transição epitélio mesenquimal
<b>TEndM</b>	Transição endotélio mesenquimal
<b>TFG</b>	Taxa de filtração glomerular
<b>TGF-β:</b>	Fator de transformação do crescimento-β
<b>TNF- α</b>	Fator de necrose tumoral-α
<b>TIMP</b>	Inibidor tecidual de metaloproteinase
<b>Tregs:</b>	Células T reguladoras
<b>UTI:</b>	Unidades de terapia intensiva
<b>VCAM-1:</b>	Molécula de adesão celular vascular-1
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>XDH</b>	Xantina-desidrogenase

## RESUMO

Donizetti-Oliveira, C. “ESTUDOS DOS MECANISMOS RENOPROTETORES DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇA RENAL CRÔNICA”. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. São Paulo/2014.

Atualmente cerca de 13% da população mundial é afetada por algum grau de doença renal crônica, com um percentual de 45% de mortes atribuídas a desordens de caráter fibrótico. Neste contexto, novas formas terapêuticas de tratamento se tornam imprescindíveis, como por exemplo, uso de terapia celular com células-tronco mesenquimais. Essas células podem ser obtidas do tecido-adiposo (CTAd) tornando-se possíveis terapias devido a sua fácil obtenção e propriedades pró-regenerativas, principalmente as exercidas por ações parácrinas. Portanto, neste presente trabalho analisamos o papel da CTAd na redução da progressão da fibrose renal em dois modelos experimentais: 1) de isquemia e reperfusão renal unilateral severa (IR) e 2) de nefrite túbulo-intersticial (NTI). Inicialmente, as CTAd foram isoladas de camundongos C57BL/6j, e foram caracterizadas fenotipicamente e funcionalmente. Após sua caracterização, as CTAds foram administradas por via intraperitoneal ( $2.10^5$  células/animal) em diferentes tempos após insulto inicial, e os animais foram avaliados 24 horas, 6 e 10 semanas após a IR e 10 dias após a indução da NTI. No modelo de IR, no tempo de 24 horas, os animais tratados com CTAd apresentaram reduzida disfunção renal e tubular e um aumento do processo regenerativo. Adicionalmente, a expressão renal de transcritos pró-inflamatórios (IL-6 e TNF) foi diminuída, enquanto que o nível de moléculas

antiinflamatórias e citoprotetoras (IL-4, IL-10 e HO-1) foram aumentadas. Apesar da melhora funcional, as CTAd não foram observadas nos rins dos animais transplantados. Como esperado, após 6 semanas de IR, os rins dos animais não tratados retraíram, enquanto os rins dos animais tratados com CTAd permaneceram íntegros com menor deposição de fibras de colágeno do tipo 1 (Col-1) e menos expressão do marcador de fibrose FSP-1. A proteção renal observada em animais tratados com CTAd foi acompanhada por uma redução nos níveis séricos de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , KC, RANTES e IL-1 $\alpha$ . No modelo de NTI o mesmo padrão foi observado, ou seja, os rins dos animais tratados apresentaram menor disfunção renal com reduzida expressão de moléculas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) e diminuição da área fibrótica observada principalmente pela coloração de Picrosírius e imunohistoquímica para marcadores pró-fibróticos como FSP-1 e Col-1. Surpreendentemente, quando avaliamos o tratamento das CTAd com 6 semanas de IR, período em que os animais já apresentavam fibrose, foi constatado uma melhora nos parâmetros funcionais e menos fibrose e redução da expressão de RNAm de Col-1 e vimentina, além de menor expressão de FSP-1. Conclusivamente, nossos resultados demonstram que a terapia com CTAd pode afetar a progressão da fibrose renal, pela modulação da resposta inflamatória inicial. Acreditamos que essa proteção possa estar relacionada a modulação dos mecanismos que governam a transição epitelial/endotélio-mesenquimal. Esperamos que esse trabalho possa contribuir para a identificação de potenciais vias de lesão ou de regeneração, facilitando a sua tradução mais simples e rápida para a prática clínica.

**Palavras Chave:** 1. Células-tronco mesenquimais. 2. Lesão Renal Aguda / Doença Renal Crônica. 3. Inflamação. 4. Fibrose

**ABSTRACT**

Donizetti-Oliveira, C. "ROLE OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS IN THE PROGRESSION OF PROGRESSION OF CHRONIC RENAL DISEASE". Dissertation (PhD). Federal University of São Paulo - Paulista School of Medicine. São Paulo/2014.

Currently 13% of the world population is affected by some degree of chronic kidney disease, with a percentage of 45% of deaths attributed to disorders of fibrotic character. In this context, the establishment of alternative treatments becomes essential, as for example, the use of cell-based therapy with mesenchymal stem cells. These cells can be obtained from adipose tissue (ASC), becoming possible therapeutic targets, due to its accessibility and pro-regenerative properties, especially those performed by paracrine actions. Therefore, in this study we analyzed the role of ASC in reducing the progression of renal disease in two experimental models: 1) severe unilateral renal ischemia and reperfusion injury (IR) and 2) tubule-interstitial nephritis (TIN). Initially, ASC were isolated from of C57BL/6j mice and were characterized phenotypically and functionally. After characterization, ASC were administered intraperitoneally ( $2 \cdot 10^5$  cells / animal) and animals were evaluated 24 hours, 6 and 10 weeks after IR, and 10 days after the induction of TIN. In the IR model, the animals treated with ASC showed reduced renal tubular dysfunction and an increase in the regenerative process after 24 hours. Furthermore, renal expression of pro-inflammatory transcripts (TNF and IL-6) was reduced in animals treated with ASC, while the level of anti-inflammatory and cytoprotective molecules (IL-4, IL-10 and HO-1) was increased. Despite functional improvement, ASCs were not found in the kidneys of transplanted

animals. As expected, untreated kidneys demonstrated reduced size at 6 weeks after IR, whereas the kidneys of ASC-treated animals remained normal in size, showed less type 1 collagen deposition and decreased staining for the fibrosis marker FSP-1 and hypoxyprobe. The renal protection seen in ASC-treated animals was followed by reduced serum levels of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , KC, RANTES and IL-1 $\alpha$ . In the TIN model the same pattern was observed, where kidneys of treated animals showed less renal dysfunction with decreased expression of pro-inflammatory molecules (TNF- $\alpha$  and IL-6) and decreased fibrotic area, observed mainly by picrosirius staining and immunohistochemistry for pro-fibrotic markers as FSP-1 and type 1 collagen. Surprisingly, when evaluating the treatment of ASC, 6 weeks after IR, an interval where interstitial fibrosis was already present, we found an improvement in functional parameters and reduced fibrotic process analyzed by picrosirius staining and reduced expression of mRNA for type 1 collagen and vimentin, in addition to lower expression of FSP-1. In conclusion, our results showed that ASC therapy can affect the progression of renal fibrosis, through modulation of the initial inflammatory response. We believe this protection may be associated with the regulation of mechanisms that govern epithelial/endothelial-mesenchymal transition. We expect this study may contribute towards the identification of potential renal injury or regeneration pathways, facilitating its translation to clinical practice in an easier and simpler manner.

**Key Words:** 1. Mesenchymal stem cells. 2. Acute Kidney Injury / Chronic Kidney disease. 3. Inflammation. 4. Fibrosis.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Lesão Renal Aguda (LRA)

LRA é uma doença de grande repercussão clínica, uma vez que está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade, afetando cerca de 20% de todas as internações hospitalares, com mortalidade variando de 15% em pacientes com insuficiência renal aguda isolada, para cerca de 50% a 80% nos pacientes nas unidades de terapia intensiva (UTI).<sup>1-3</sup>

A LRA é definida como um declínio abrupto da função renal, gerando distúrbios hidroeletrólíticos e de balanço ácido/básico decorrentes da perda do clearance de pequenos solutos (creatinina, uréia,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e metabólitos) como também do decréscimo da taxa de filtração glomerular. Deste modo, ao englobar pacientes com diversas síndromes e com pequenas alterações na função renal e não apenas aqueles com necessidade de terapia renal substitutiva, atualmente o termo LRA veio em substituição ao termo antigo insuficiência renal aguda (IRA).<sup>4</sup>

A LRA pode ser resultado de múltiplos fatores: redução da perfusão renal sem lesão celular, de um insulto isquêmico, tóxico ou obstrutivo dos túbulos renais, de um processo túbulo intersticial com inflamação e edema ou por uma redução da capacidade de filtração por uma patologia primária do glomérulo.<sup>5</sup> Além disso, a LRA é frequentemente considerada uma doença multifatorial, com concomitante isquemia, nefrotoxicidade, componentes sépticas e com sobreposição de mecanismos patogênicos.<sup>6</sup>

A isquemia e a nefrotoxicidade aparecem como as causas mais comuns da LRA. Neste trabalho um dos modelos experimentais utilizados foi o modelo experimental de lesão de isquemia e reperfusão (IR) proposto por Rabb e

colegas.<sup>7</sup> Nesse modelo, após a IR ocorrem alterações renais estruturais e bioquímicas que resultam em vasoconstrição, descamação das células tubulares, obstrução tubular intraluminal e retorno do filtrado glomerular. Além disso, mesmo 6 semanas depois da lesão inicial, ainda podia ser encontrado inflamação (elevados níveis de IL-1b e TNF- $\alpha$ ), fibrose renal e alterações na estrutura renal.<sup>6</sup>

Na fisiopatologia da LRA, primeiramente ocorrem alterações morfológicas, sendo observado perda da integridade do citoesqueleto e polaridade celular, formação de “bolhas” nas membranas apicais das células do túbulo proximal, com perda da borda em escova e rompimento das *tight junctions* como consequência das alterações na rede de actina e de microtúbulos do citoesqueleto.<sup>8,9</sup> De forma adicional há translocação de moléculas de adesão e outras proteínas de membrana, tais como Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase e  $\beta$ -integrinas da membrana basolateral para a membrana apical, ocorrendo também apoptose e necrose das células tubulares.<sup>10</sup> Nesse sentido, a perda da barreira de células epiteliais e das *tight junctions* entre as células viáveis, podem resultar no retorno do filtrado glomerular, reduzindo ainda mais a eficácia da filtração glomerular. A persistência da lesão e/ou sua severidade, pode acarretar na descamação de células viáveis e não viáveis, levando ao aparecimento de áreas desnudas onde a membrana basal permanece como a única barreira entre o filtrado e o interstício peritubular. Esse processo permite o retorno do filtrado, especialmente em circunstâncias em que a pressão no túbulo está aumentada devido à obstrução intratubular resultante de detritos celulares que interagem com proteínas, tais como a fibronectina localizadas internamente ao lúmen.<sup>11</sup>

A lesão do epitélio tubular promove a geração de mediadores inflamatórios e vasoativos, que podem atuar sobre a vasculatura aumentando a

vasoconstrição e inflamação. Esse fenômeno ocorre devido a interação entre o CD11a/CD18 e CD11b/CD18 com a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) localizadas nos neutrófilos e células endoteliais, respectivamente. Posteriormente, os neutrófilos liberam espécies reativas de oxigênio (EROs), proteases, mieloperoxidase, e outras enzimas as quais danificam o tecido adjacente. Estas substâncias, juntamente com leucotrieno B<sub>4</sub> e fator ativador de plaquetas, podem, ambos, aumentar a permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão que sustentam a inflamação.<sup>12-14</sup> A persistência do insulto leva a manutenção do quadro inflamatório, o que acarreta a longo prazo, o desenvolvimento e estabelecimento do quadro de doença renal crônica.

### **1.2. Lesão renal Aguda e Doença Renal Crônica**

Estudos clínicos realizados há mais de 50 anos já demonstraram que um simples episódio de LRA poderia levar a uma perda de função renal maior do que esperado. Eles atribuíram esta disfunção crônica ao dano vascular e a ruptura da membrana basal com uma regeneração epitelial anômala, resultando em perda substanciais de néfrons.<sup>15,16</sup>

Recentemente, entre 2008 e 2012, estudos observacionais com coortes únicos de pacientes com LRA e com utilização de uma grande base de dados demonstraram que os pacientes que sobrevivem a um episódio de LRA possuem um risco significativo para progressão para estágio avançado de doença renal crônica (DRC).<sup>17-20</sup>

Um desses estudos, realizado em Washington, utilizando mais de 79.000 pacientes hospitalizados com e sem LRA, tendo como controle pacientes com pneumonia ou infarto agudo do miocárdio sem LRA, demonstrou ao longo de 5 anos de acompanhamento que em todos os grupos houve deterioração da

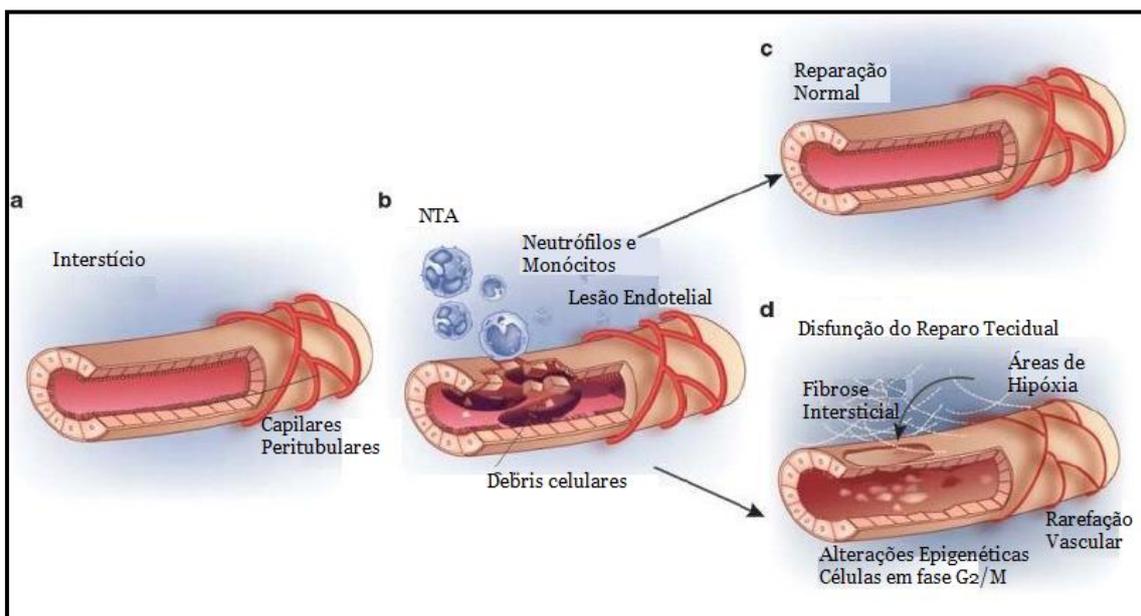
função renal, mas com maior gravidade nos pacientes previamente acometidos com insuficiência renal aguda e necrose tubular aguda (NTA). O estudo também evidenciou que esses pacientes afetados com disfunção renal possuíam altos riscos para desenvolvimento de DRC e uma sobrevida menor em relação aos controles.<sup>19</sup>

Outro dado interessante é a relação entre gravidade da LRA e a progressão da DRC. Outro estudo com uma coorte de 11.589 pacientes, utilizando a creatinina como marcador de severidade da LRA, mostrou que os pacientes que necessitaram de diálise tinham um risco maior de progressão para DRC do que pacientes com LRA não dialítico.<sup>17</sup> De forma semelhante, pacientes que apresentaram múltiplos episódios de LRA, tinham maior probabilidade de progressão para DRC em comparação com pacientes com episódio isolado. Thakar *et al.* também demonstraram, em uma coorte de veteranos norte-americanos com diabetes, que pacientes com dois ou mais episódios de LRA eram mais propensos a progredir para o estágio mais avançados de DRC do que os pacientes que experimentaram um episódio único.<sup>21</sup>

Esse crescente risco de progressão para DRC em pacientes que desenvolvem a LRA não se limita aos pacientes adultos, mas afeta também a população pediátrica. Grandes estudos de coorte pediátricos sugerem que certos subgrupos de crianças (como pacientes de transplante de medula óssea) possuem um alto risco para progressão da DRC.<sup>22,23</sup> Hui-Stickle *et al.* avaliaram pacientes pediátricos em unidades de terapia intensiva, onde 34 % tiveram redução da função renal ou se tornaram diálise dependentes.<sup>24</sup> Outros trabalhos também mostraram uma alta morbidade e mortalidade em populações pediátricas após um episódio de LRA. Esses pacientes apresentaram diversos

sintomas clínicos de DRC como: hiperfiltração, função renal reduzida, hipertensão e microalbuminúria.<sup>25</sup>

De forma complementar, estudos experimentais utilizando modelos animais sugerem que os rins após episódios de LRA podem progredir para um estágio de DRC, independente da causa inicial da LRA.<sup>26-28</sup> O exato mecanismo pela qual a LRA inicia ou acelera o desenvolvimento de DRC ainda é incerto. Dados pré-clínicos, no entanto, sugerem que uma variedade de mecanismos podem estar envolvidos, como perda de néfrons e hipertrofia tubular, inflamação intersticial, fibrose, lesão endotelial, rarefação vascular, ciclo celular e mal adaptação do reparo tecidual (Figura 1).



**Figura1: Alterações no túbulo renal e no ambiente peritubular na progressão da LRA para DRC:** **a)** secção de túbulo renal normal, com células epiteliais normais, interstício renal, e vasos peritubulares sem alterações; **b)** secção de túbulo renal com necrose tubular aguda, necrose de células epiteliais, detritos celulares intra-tubular, lesão endotelial e dos capilares peri-tubulares, com migração de macrófagos e monócitos no interstício renal; **c)** secção de túbulo renal com reparação e regeneração normal da arquitetura renal; **d)** secção de túbulo renal após episódio de LRA, resultando em uma regeneração incompleta. Nesse processo anômalo caracteriza-se com as células epiteliais com evidências de parada no ciclo celular com subsequente mudança epigenética a favor de fenótipo de fibrose; interstício renal com evidências de fibrose; diminuição da densidade vascular; combinação do decréscimo de suprimento sanguíneo e fibrose leva a zonas de hipóxia que em combinação com o decréscimo de suprimento vascular e geração de fibrose pode iniciar um ciclo vicioso com aumento de

formação de fibrose. Figura adaptada de “*Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease*”, Lakhmir S Chawla, 2012 <sup>29</sup>.

### **1.2.1 Perda de Néfrons e hipertrofia glomerular:**

Estudos pré-clínicos tem demonstrado que após um episódio de LRA, a perda permanente e significativa de néfrons é comparável ao modelo experimental animal de rim remanescente (Nx5/6 em ratos), em que após nefrectomia subtotal, os néfrons remanescentes são responsáveis pelo aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) via hiperfiltração e hipertrofia glomerular. Conseqüentemente esse processo ao longo do tempo gera lesões nefróticas com continua proliferação celular que cronicamente resulta em fibrose túbulo-intersticial e perda progressiva de néfrons. <sup>30</sup> A patofisiologia envolvida no fenômeno de perda de néfrons e hipertrofia glomerular tem sido bem descrito em modelos experimentais.<sup>27</sup> Ocorrem adaptações na microcirculação dos glomérulos remanescentes, gerando um aumento do *drive* de força a favor da filtração que resulta em aumento da taxa de filtração. O aumento da taxa de filtração por néfron é proporcional à quantidade de néfrons perdidos, em que quanto maior for o dano, maior será a taxa de filtração por néfron remanescente. Esta hipertrofia funcional é considerada benéfica no sentido que mantém a taxa de filtração global próximo ou dentro da normalidade. Entretanto, o que a literatura e a clinica nos mostra é que ocorrem lesões continuas no néfron, havendo esclerose glomerular acompanhada de progressiva azotemia, proteinúria e hipertensão arterial, com elevada perda subsequentemente de néfrons. <sup>28</sup>

### **1.2.2 Inflamação intersticial:**

A resposta inflamatória é um importante contribuinte para o dano tecidual associado ao episódio de LRA, uma vez que esse processo é responsável pela geração de um desarranjo na microcirculação e posteriormente alterações funcionais das células tubulares, sendo que a intensa produção e liberação de mediadores inflamatórios locais podem ainda contribuir para a redução do fluxo sanguíneo na medula renal, com consequências severas para a função e viabilidade tubular.<sup>31-33</sup>

Após uma IR, as células endoteliais contribuem para disfunção do órgão ao aumentar a expressão de moléculas como integrinas, selectinas e membros da superfamília das imunoglobulinas, incluindo ICAM-1 e moléculas de adesão celular vascular. O aumento da interação leucócito/endotélio pode resultar em adesão célula-célula levando a uma diminuição do fluxo sanguíneo e agravamento do dano renal.<sup>34</sup> Por outro lado, o aumento de expressão de ICAM-1 está associado com a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . No decorrer do curso da LRA, mais precisamente em sua fase tardia, há a ocorrência de um infiltrado intersticial de macrófagos e linfócitos T, os quais se sobrepõem ao ingresso inicial da população de neutrófilos inflamatórios. Além de citocinas inflamatórias, EROs são geradas durante a reperfusão, e desempenham um papel importante na lesão das células tubulares epiteliais. Estas, por sua vez, não só contribuem para a reação inflamatória através da geração de citocinas quimiotáticas tais como TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ , MCP-1, IL-8 e RANTES, como também ativam os linfócitos T, sustentando e agravando o processo inflamatório.<sup>35</sup>

Na literatura é relatado que a molécula TGF- $\beta$  é um potente inibidor da resposta inflamatória, porém paradoxalmente, o TGF- $\beta$  é o principal fator

fibrinogênico, podendo induzir fibrose intersticial crônica e ativar a transição epitélio mesenquimal (TEM)<sup>36</sup> e transição endotélio mesenquimal (TEndM).<sup>37</sup> Dados recentes têm demonstrado um papel direto do TGF- $\beta$  como um mediador da LRA.<sup>38</sup>

### **1.2.3 Fibrose:**

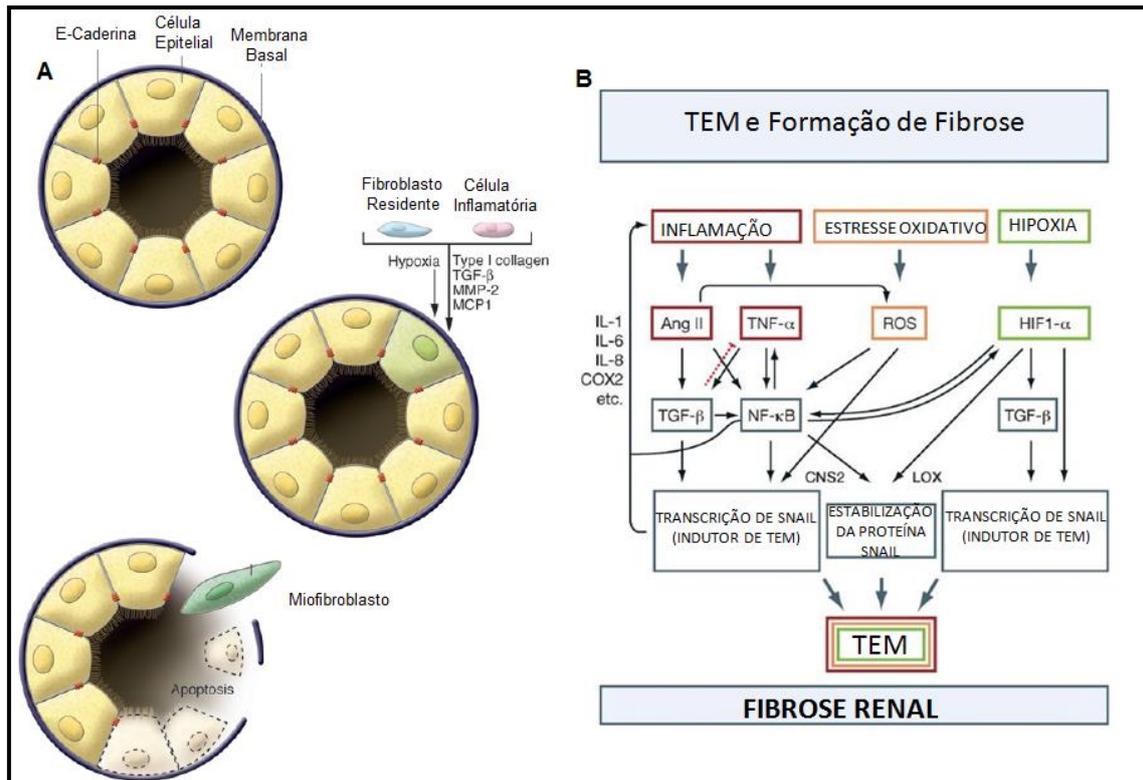
Durante a formação do estado de fibrose renal temos a ocorrência de um infiltrado de células inflamatórias, ativação e expansão de fibroblastos, produção e deposição de abundantes componentes da matriz extracelular, atrofia tubular e rarefação dos capilares peritubulares.<sup>39</sup> Neste processo de formação de fibrose, o TGF- $\beta$  é o principal agente mediador,<sup>40</sup> pois promove proliferação de fibroblastos, síntese de matriz extracelular e inibição da collagenase em múltiplos órgãos, eventos estes característicos tanto da TEM quanto da TendM.<sup>36,37,41</sup>

Desordens renais de caráter crônico e progressivo, inevitavelmente culminam em um estado de fibrose renal, onde há a ativação e acúmulo de um grande número de fibroblastos ou miofibroblastos produtoras de componentes da matriz extracelular. Os fibroblastos ou miofibroblastos possuem diversas origens, podendo ser fibroblastos residenciais, pericitos vasculares, advir da TEM ou da medula óssea (fibrócitos circulantes).<sup>42,43</sup>

Recentemente, a TEndM também tem sido sugerida como um fator gerador de fibrose, sendo reconhecido como um novo mecanismo para a geração de miofibroblastos.<sup>44</sup> Em ambos os processos de TEM ou TEndM, as células epiteliais ou endoteliais perdem a aderência e polaridade apical/basal, se tornando células altamente invasivas, migratórias e fusiformes, com característica de células mesenquimais alongadas. Adicionalmente, alterações

bioquímicas acompanham estas mudanças morfológicas e funcionais, havendo diminuição da expressão de marcadores epiteliais e endoteliais com aquisição de marcadores mesenquimais, originando dessa forma as células responsáveis pela secreção ativa de matriz extracelular.<sup>39,45</sup>

A TEM pode ser vista como uma resposta adaptativa das células epiteliais após estresse crônico ou lesão. O distúrbio homeostático causado pela hipóxia, estresse oxidativo e inflamação podem em conjunto produzir e liberar várias quimiocinas e citocinas, as quais atraem e dirigem o influxo de células inflamatórias para o espaço túbulo-intersticial. Este infiltrado celular torna-se ativado e produz um gradiente de fatores solúveis, inclusive moléculas pró-inflamatórias, citocinas pró-fibróticas e matriz metaloproteinase 9 (MMP-9),<sup>46</sup> criando um microambiente hostil para células epiteliais e endoteliais. Aliado a esse processo, ainda existe a ocorrência durante a fase inicial do processo inflamatório antecessor a fibrose renal, a liberação de citocinas pelo infiltrado inflamatório como IL-1, TNF $\alpha$ , e IFN $\gamma$ , as quais potencializam nas células tubulares o fenômeno de TEM desencadeado por ação do TGF- $\beta$ , induzindo concomitantemente a expressão na mesma célula do receptor de TGF- $\beta$ .<sup>47</sup> Por sua vez, a sinalização TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B estabiliza o fator de transcrição *Snail* (potente indutor de TEM), bloqueando a sua ubiquitinação, proporcionando outro *link* molecular entre a inflamação e o mecanismo de TEM.<sup>48,49</sup> (Figura 2)



**Figura 2: TEM e formação de fibrose:** A) Células Inflamatórias e fibroblastos residentes ativados (miofibroblastos) liberam diversas moléculas que levam a degradação da membrana basal e perda da polaridade apical/basal das células epiteliais tubulares que entram em processo de apoptose ou TEM. B) Cooperação entre Inflamação, estresse oxidativo e hipóxia na indução de TEM para a progressão de fibrose. Figura Adaptada de Kalluri, R e López – Novoa, 2009.<sup>36,50</sup>

#### 1.2.4 Disfunção no reparo tecidual

Durante a progressão da LRA para DRC, o processo de TEM pode também ser decorrente da disfunção na reparação do tecido, levando a formação de fibrose tecidual devido à produção excessiva de agentes pró-fibróticos, tais como TGF- $\beta$ , CTGF e colágeno tipo I. Neste sentido, Yang e colaboradores,<sup>51</sup> demonstraram nos rins lesionados acometidos de fibrose a ocorrência de grandes números de células epiteliais de túbulo proximal localizadas na fase G2/M do ciclo celular. Nesta fase células tubulares levam a ativação de c-jun NH (2)-quinase terminal (JNK), a qual sinaliza para uma

maior produção de citocinas pró-fibróticas, fazendo com que haja mudança de um fenótipo tubular clássico para outro com características fibroblastóides.<sup>51</sup>

Esses resultados sugerem que, em resposta à lesão, um processo de má adaptação do reparo renal pode ocorrer, causando fibrose ao invés de reparação do epitélio tubular. A parada na fase G2/M do ciclo celular faz com que as células epiteliais tubulares se convertam em um fenótipo, o qual promove o crescimento e ativação de fibroblastos. Nesse momento, se a secreção e ativação de TGF- $\beta$ 1 é sustentada, as mudanças epigenéticas em fibroblastos podem surgir, o que pode transformá-los em miofibroblastos ativos, os quais proliferam independentemente de qualquer fator de crescimento.<sup>52</sup>

Concomitantemente, mudanças no ciclo celular e alterações epigenéticas representam pelo menos dois mecanismos de má reparação que parecem desempenhar papéis determinantes na formação da fibrose após um evento de LRA.<sup>52-54</sup>

#### **1.2.5 Lesão endotelial e rarefação vascular:**

Modelos experimentais de LRA demonstraram o envolvimento do endotélio e da lesão vascular na progressão da doença. Embora a reparação tubular após a lesão ocorra de maneira intensa, a capacidade de restauração vascular após um evento de LRA não segue o mesmo padrão.<sup>55</sup> Vários modelos diferentes de lesão (IR, folato, inibição da óxido nítrico sintase e obstrução ureteral) enfatizam que a densidade vascular diminui após a lesão,<sup>56-59</sup> com perda progressiva da rede vascular, variando entre 30 e 50%.<sup>53</sup> Essa perda da arquitetura vascular pode ser um dos componentes chave do desenvolvimento da fibrose após a LRA. O tecido lesionado contendo insuficiente suprimento sanguíneo torna-se hipóxico, gerando uma cascata de auto-propagação da lesão.

A rarefação dos capilares inicia a ativação de vias de sinalização induzida por hipóxia, as quais também podem promover a inflamação e a fibrose tecidual.<sup>30</sup> Assim, o mecanismo de rarefação capilar em focos de fibrose pode ser tanto uma causa e um efeito da hipóxia, a qual por sua vez, leva a ativação da sinalização, seguida por inflamação e ativação de fatores que aumentam a fibrose tecidual.

### **1.3 Nefrites túbulos-intersticiais (NTI)**

As nefrites túbulos-intersticiais (NTI) podem ser definidas como um envolvimento inflamatório no interstício renal acometendo os túbulos, com edema intersticial e lesão tubular aguda. Quando o agente agressor persiste, o processo é agravado pela formação de fibrose intersticial e atrofia tubular, além de infiltrado inflamatório de linfócitos, macrófagos e outras células.<sup>60</sup>

Com o intuito de estudar a fisiopatologia desta doença, temos atualmente o modelo experimental de NTI induzido por adenina. Em mamíferos, a adenina é um produto endógeno da via da poliamina e é captada pela adenina-fosforibosiltransferase (APRT). Quando a APRT funcional está ausente, a adenina passa a ser um substrato significativo para a xantina-desidrogenase (XDH), que a oxida em 2,8-diidroxiadenina (2,8-DHA), a qual é extremamente insolúvel, podendo levar a cristalúria, formação de cálculos urinários, além de exercer efeitos tóxicos diretos nas células tubulares e intersticiais renais, o que eventualmente pode acarretar em um estágio final de falência renal.<sup>61,62</sup> A ingestão de adenina a longo prazo induz distúrbios na função renal pela deposição de DHA nos túbulos renais.<sup>63</sup> Portanto, os modelos experimentais de lesão túbulo-intersticial induzida pela adenina parecem compartilhar os mesmos mecanismos fisiopatológicos da lesão renal pela deficiência da APRT

em humanos. Esses mecanismos pelos quais a deposição de cristais de DHA no rim leva à atrofia tubular irreversível e fibrose intersticial ainda não são bem compreendidos. Estudos mostraram que camundongos tratados com ração enriquecida com adenina desenvolveram nefrolitíase, seguida de insuficiência renal. Histologicamente, os rins dos animais apresentaram cristais citoplasmáticos, necrose tubular e progressiva inflamação e fibrose intersticial. Outro estudo com mesmo modelo animal mostrou aumento da expressão de RNAm para MCP-1, IL-1 $\beta$ , CCR2 e TGF- $\beta$ , assim como considerável infiltração intersticial de macrófagos e aumento de fibroblastos. Isto sugere que cristais de DHA, possivelmente, levam a resposta inflamatória ao estimularem as células epiteliais tubulares a produzirem MCP-1, levando à acumulo de macrófago, que por sua vez, induz a produção massiva de TGF- $\beta$ , o qual desencadeia a fibrose.<sup>64</sup>

Apesar dos mecanismos não serem totalmente elucidados, estudos atuais nos mostraram que uma possível via fisiopatológica seja a liberação de TGF- $\beta$  pelas células inflamatórias presentes no interstício renal. Isto correlacionaria a fisiopatologia das NTI com o processo de evolução da LRA para DRC, uma vez que ambas estariam sendo mediadas pela mesma via de sinalização controlada pela ação do TGF- $\beta$ .

Como discutido, as doenças renais apresentam grande incidência e prevalência, se apresentando de forma progressiva, resultando em falência renal com necessidade de terapia substitutiva. Mesmo com o avanço da medicina nas ultimas décadas, a incidência e a mortalidade destas doenças continuam altas, sendo o tratamento atual restrito a diálise ou ao transplante renal. Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas efetivas se torna imprescindível. Nesse campo há o crescente interesse no tratamento com

células-tronco mesenquimais, que vêm demonstrando em diversos estudos um grande potencial imunomodulador e regenerativo para as doenças renais.<sup>65-67</sup>

#### **1.4. Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo**

Células-tronco mesenquimais (CTMs) são consideradas células progenitoras mesenquimais multipotentes sendo classicamente definidas pela sua habilidade de aderência ao plástico, alta replicação e potencial de diferenciação em células de linhagem mesodermal, como osteócitos, condrócitos e adipócitos. Há múltiplos marcadores de superfície que podem ser usados para definir CTMs, incluindo marcação positiva para CD105, CD73 e CD90 e negativa para CD45, CD34, CD31, CD14 (ou CD11b), CD79a (ou CD19) e HLA-DR.<sup>68</sup>

As CTMs podem ser obtidas de diversos tecidos, incluindo medula óssea,<sup>69</sup> músculo,<sup>70</sup> cordão umbilical,<sup>71</sup> sangue periférico,<sup>72</sup> polpa de dente,<sup>73</sup> periósteo,<sup>74</sup> tecido adiposo<sup>75</sup> dentre outros.

Terapeuticamente, as CTMs possuem grande potencial. Estas células têm a capacidade de migrar para o tecido lesionado e produzir diferentes fatores tróficos tais como citocinas e fatores de crescimento, os quais estão relacionados com os mecanismos de regulação imune, anti-fibrótico, suporte endógeno de células progenitoras, anti-apoptose e angiogênese.<sup>76,77</sup> (Figura 3).

##### **1.4.1 Células-tronco Mesenquimais e Inflamação**

As células inflamatórias estão presentes durante as fases iniciais da LRA, onde macrófagos, neutrófilos e células T podem promover ativamente o processo de desenvolvimento da doença.<sup>13,78,79</sup> As CTMs podem agir no início do processo de desenvolvimento da LRA através do seu conhecido papel imunomodulador sobre as células do sistema imune. Isto pode ocorrer através

do contato célula-célula (através da interação das PDL-1, HLA-G5 e CTLA-4) e pela secreção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (por exemplo, IL-10, PGE - 2, IDO, iNOS e HLA- G5). Estes potenciais efeitos das CTMs podem diminuir a expressão/atividade de vários tipos de células inflamatórias, tais como as células T CD4+, T CD8+, NK, células B , macrófagos e células dendríticas enquanto aumenta a atividade de células T reguladoras, diminuindo assim a inflamação associada a LRA, restituindo a função renal.<sup>77,80</sup>

Vários estudos têm utilizado modelos experimentais de LRA para demonstrar este fenômeno. Nestes estudos, o tratamento com CTMs tem sido associado com a modulação da inflamação, levando a mudança da resposta Th1 para Th2, em que o papel protetor das CTMs foi confirmado pela restauração da função renal e diminuição de expressão de diversos fatores como moléculas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-6), moléculas de adesão (ICAM-1) e quimiocinas (CXCL-2, MIP-2, GM-CSF, KC e MCP-1). Por outro lado, moléculas associadas com a resposta imune Th2, tais como IL-10 e IL-4, tiveram sua expressão aumentada depois da administração das CTMs.<sup>67,80-83</sup>

#### **1.4.2 Células-tronco mesenquimais e Angiogênese**

O suprimento sanguíneo adequado é fundamental para a recuperação da função renal, e fatores advindos das CTMs são capazes de restaurar a vasculatura e perfusão renal após o rim sofrer uma lesão.<sup>84,85</sup> As propriedades pró-angiogênicas das CTMs estão intimamente associadas com a recuperação tecidual, e agem especificamente por duas maneiras: as CTMs podem atuar de forma estrutural agindo como células semelhantes a pericitos vasculares, sustentando a nova vasculatura, ou as CTMs através da secreção de moléculas

fortemente associados com o processo de angiogênese, incluindo VEGF, podem estimular a formação de novos vasos.<sup>76,86,87</sup>

#### ***1.4.3 Células-tronco mesenquimais e a estimulação de células progenitoras:***

É conhecido que o rim possui propriedades regenerativas que estão principalmente ligadas ao grande número de células progenitoras residentes no tecido renal. Essas células renais especiais, que são responsáveis pela restauração do tecido, tem sido encontradas na papila renal,<sup>88</sup> epitélio tubular<sup>89</sup> e cápsula de Bowman.<sup>90</sup> As CTMs possuem a inerente habilidade de secretar diversos fatores de crescimento (por exemplo, SCF, LIF, angiopoetina, M-CSF, HGF e SDF-1), os quais estimulam a proliferação e geração de novas células, auxiliando assim o reparo tecidual.<sup>76,91,92</sup>

#### ***1.4.4 Células-tronco mesenquimais e Apoptose:***

Um importante papel na proteção tecidual mediada pelas CTMs é a sua capacidade de inibir apoptose. Estudos mostram que esta capacidade de inibir apoptose em tecido renal ou outros órgãos é realizado através do aumento de fatores de sobrevivência, como expressão de Akt em células lesadas,<sup>66</sup> BDNF e aumento de expressão de fatores de crescimento como IGF, VEGF e HGF, os quais potencialmente inibem apoptose e estimulam proliferação celular.<sup>91,93,94</sup>

#### ***1.4.5 Células-tronco mesenquimais e Estresse Oxidativo:***

O estresse oxidativo é um clássico mecanismo envolvido na inflamação gerada após o evento de LRA, sendo que a produção de EROs e ERNs são entidades intimamente ligadas à patogênese da doença renal.<sup>95</sup> Dessa maneira,

as CTMs podem controlar o balanço antioxidante/oxidante gerados após lesão renal, principalmente via liberação de HO-1 e EPO, contribuindo para a diminuição de estresse oxidativo e recuperação da função renal.<sup>96-99</sup>

#### **1.4.6 Células-tronco mesenquimais e Fibrose:**

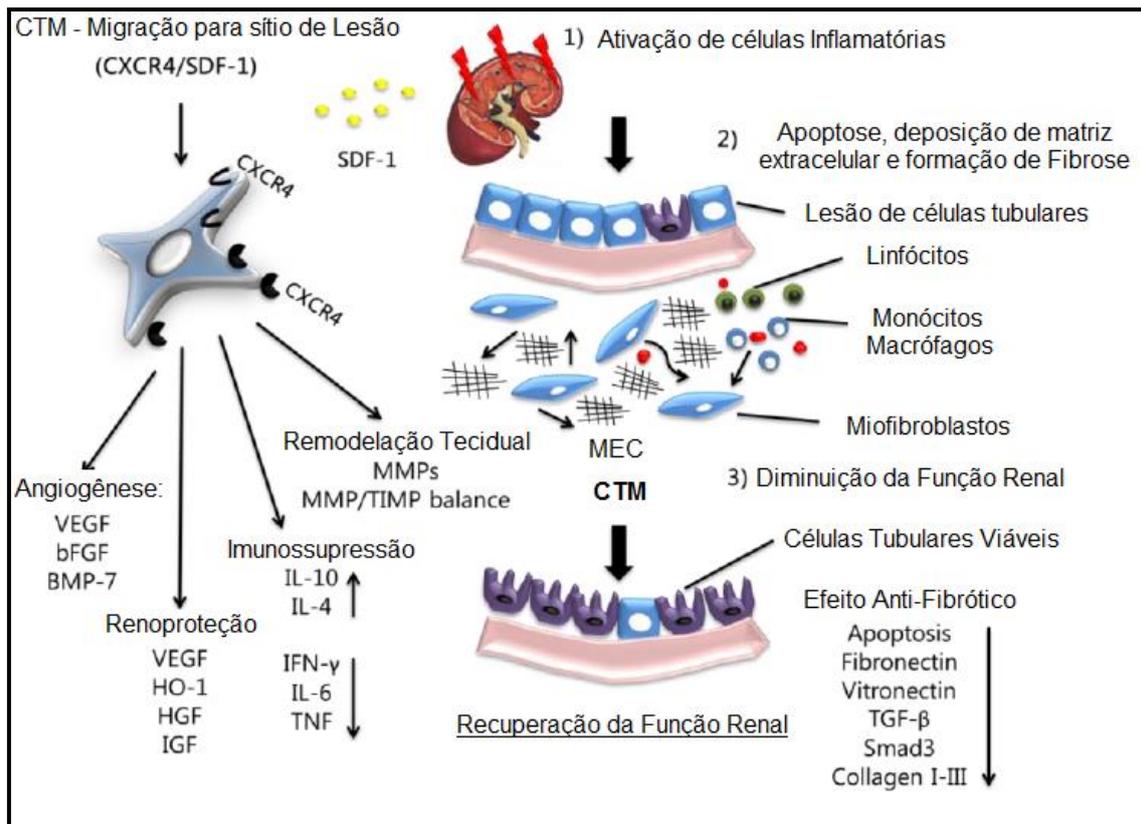
Diferentes estudos utilizando modelos animais já demonstraram os benefícios anti-fibróticos do uso das CTMs. Nosso grupo, em um modelo experimental de DRC, demonstrou que administração de CTM gera uma maior expressão de HO-1, BMP-7, Smad-7 e HGF, os quais são consideradas potenciais moléculas com propriedades anti-fibróticas. O aumento de expressão destes marcadores estão associados com a redução de área fibrótica em tecido renal, avaliado através das colorações de Tricômio de Masson e Picrosírius. Adicionalmente, marcadores de TEM ( $\alpha$ -SMA, FSP-1 e Vimentina) e de matriz extracelular (colágeno tipos I e III, fibronectina, TIMP-1) também se encontraram reduzidos pós o tratamento com CTM.<sup>65</sup>

Cavaglieri e colaboradores, em um modelo de nefrectomia 5/6 avaliou o efeito das CTM quando injetadas por via subcapsular no rim. Eles observaram diminuição da hipertensão sistêmica nos animais tratados, além de significativa redução da glomerulosclerose e melhora da função renal nos animais após 30 dias de tratamento.<sup>100</sup> Utilizando o mesmo modelo animal de nefrectomia 5/6, Alexandre e colaboradores observaram após administração de células-tronco advindas da medula óssea uma redução na mortalidade, diminuição da progressão da glomerulosclerose e do processo inflamatório, além de melhora funcional com diminuição de proteinúria. Interessantemente, neste estudo não foi observado diferença do padrão de infiltrado de células inflamatórias entre os grupos que receberam apenas uma infusão de células daqueles que receberam

três, demonstrando que a redução da glomeruloesclerose ocorreu independente do número de infusões realizadas.<sup>101</sup>

Considerando outros órgãos, Leung e colaboradores estudaram o efeito das CTM em um modelo de degeneração de disco intervertebral. Observaram que as CTM foram capazes de inibir a formação de fibrose no núcleo pulposo na coluna vertebral de coelhos, reduzindo depósito anormal de colágeno tipo I e mediadores pró-fibróticos, com preservação das propriedades mecânicas e funcionais da espinha.<sup>102</sup>

Outros estudos mostram que após administração de CTMs ocorre uma redução de marcadores de fibrose ( $\alpha$ -SMA, FSP-1, colágeno) e um aumento de moléculas reconhecidas como renoprotetoras e antifibróticas como: HO-1, BMP-7, Smad-7, VEGF e HGF.<sup>103,104</sup> Apesar do mecanismo preciso de reparo permanecer ainda incerto, acredita-se que a modulação da expressão de matrix metaloproteinases e de inibidores destas enzimas estejam diretamente relacionadas a este efeito protetor das CTMs.<sup>105,106</sup> (Figura 3)



**Figura 3: Mecanismo associado ao efeito anti-fibrótico das CTMs na progressão da DRC.** CTMs podem reconhecer sinais de dano tecidual e migrar para os locais de lesão. A formação de fibrose renal pode ser caracterizada por três passos principais: 1) ativação de células inflamatórias residentes; 2) apoptose, deposição de matriz extracelular e formação de tecido fibrótico; e 3) comprometimento das funções renais. Então, CTMs, através de vários mecanismos (pró-angiogênico, renoproteção, imunossupressão e remodelação do tecido), pode remodelar a área de fibrose, diminuir o índice de apoptose e estimular a angiogênese, restaurando assim a função renal. Adaptado de Book: Stem Cell-Dependent Therapies Mesenchymal Stem Cells in Chronic Inflammatory Disorders, Chapter: MSCs Attenuate Renal Fibrosis, 2014.

Como demonstrado, diferentes estudos apontam a administração de CTMs como uma forma alternativa de tratamento de diversas doenças, com melhora de parâmetros histológicos, funcionais, diminuição de hipóxia crônica e redução de fibrose. Aqui, formulamos a hipótese de que as CTMs poderiam lentificar a progressão da DRC experimental ou até mesmo reverter uma lesão crônica já instalada, ao modular o processo inflamatório e/ou as etapas da fibrogênese. Portanto, neste presente trabalho avaliamos a capacidade destas células em conter a progressão ou até mesmo reverter um quadro fibrótico já

instalado, modulando a inflamação e /os processos de diferenciação celular (TEM e TEndM). Para isso utilizamos células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, devido sua fácil obtenção e reprodutibilidade clinica através de transplante autólogo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1.Gerais:**

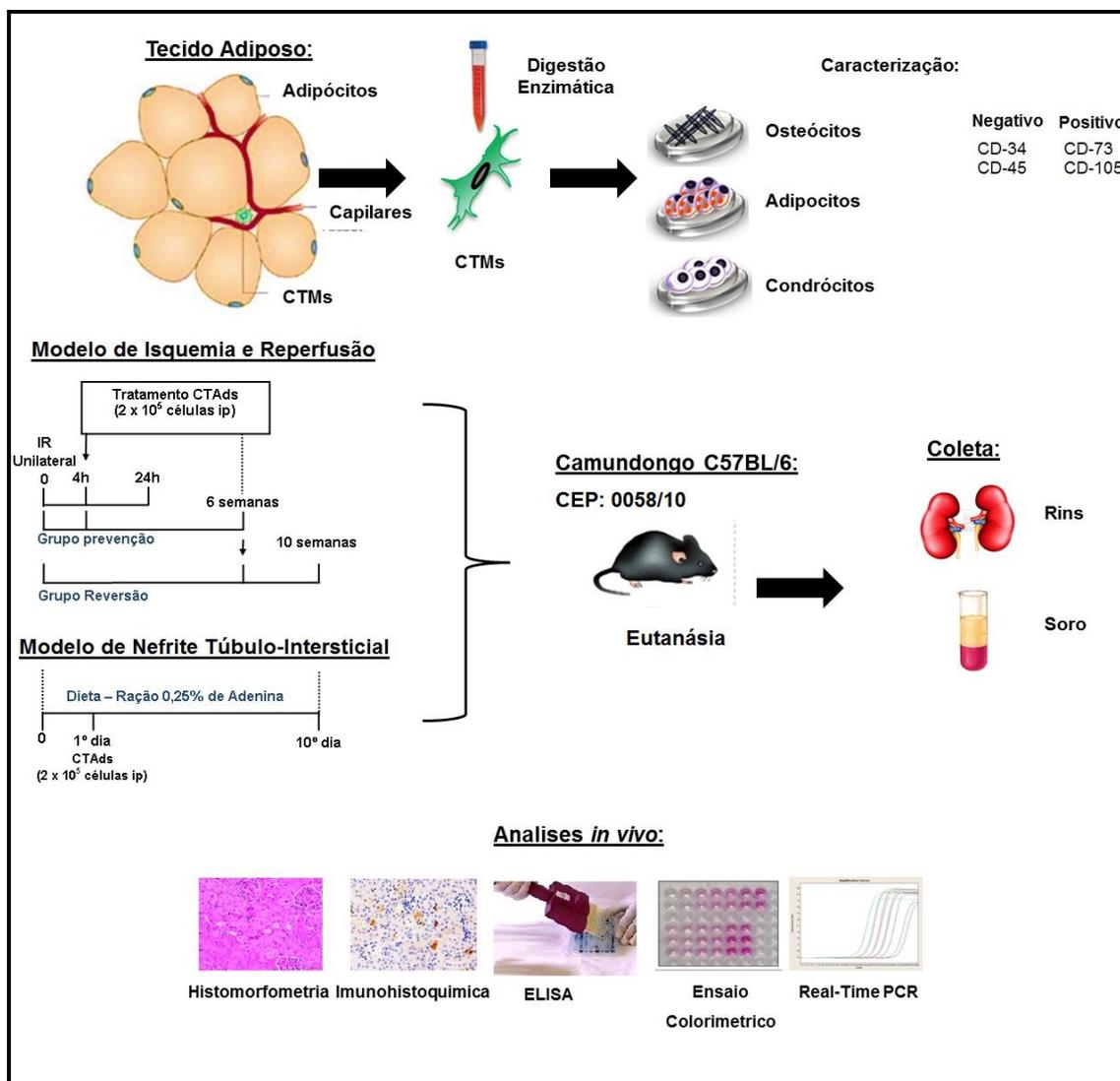
Estudar o efeito da administração de células-tronco adiposas (CTAd) no quadro de fibrose decorrente de um insulto isquêmico agudo grave ou crônico através da ingestão de ração enriquecida com adenina.

### **2.2.Específicos:**

- I. Avaliar o efeito preventivo das CTAd:
  - a. Analisar fatores anti-inflamatórios no rim submetido à isquemia, tratados ou não com as CTAd, após 24h e 6 semanas;
  - b. Analisar o padrão de fibrose no rim submetido ou não à isquemia, tratado ou não com as CTAd, após 6 semanas; e
  - c. Analisar fatores angiogênicos no rim submetido ou não à isquemia, tratado ou não com as CTAd, após 6 semanas.
- II. Avaliar a capacidade das CTAd de reverter um quadro de fibrose já instalado:
  - a. Analisar o padrão de fibrose no rim submetido ou não à isquemia, tratado ou não com as CTAd após 10 semanas; e
  - b. Analisar fatores anti-inflamatórios no rim submetido à isquemia, tratados ou não com as CTAd, após 10 semanas.
- III. Avaliar o efeito das CTAds em modelo de NTI:
  - a. Avaliar a função renal por análises bioquímicas de creatinina e uréia séricas e realizar análise histológica do tecido renal;
  - b. Analisar a expressão de RNAm de diversas citocinas, tais como: IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF; e
  - c. Verificar o padrão fibrótico no tecido renal.

### 3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Uma visão global da metodologia abordada em nosso trabalho é demonstrada na figura abaixo.



**Figura 3.** Delineamento experimental do modelo proposto para estudo dos mecanismos renoprotetores das CTAs.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### ***4.1. Abordagem experimental geral do projeto:***

As CTAd de camundongos foram isoladas, cultivadas e caracterizadas quanto ao fenótipo de marcadores de superfície e quanto à diferenciação para outras linhagens celulares e posteriormente foram administradas no modelo de isquemia e reperfusão. Parâmetros funcionais, histológicos e moleculares foram empregados para evidenciar o efeito benéfico desta estratégia, com ênfase no desenvolvimento da fibrose e do padrão de inflamação. Todas as metodologias experimentais descritas nesse trabalho foram realizadas conforme a lei federal 6638 de 1979, a qual regulamenta o emprego de animais em experimentação científica, após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo e da Universidade de São Paulo. Para esse propósito foram utilizados camundongos C57Bl/6j fêmeas (CEP: 0058/10).

### ***4.2. Isolamento de célula-tronco derivado de tecido adiposo (CTAd)***

O tecido adiposo da área inguinal de camundongo foi isolado de camundongos machos C57Bl/6j e digeridos com 0,075% de colagenase IA (Sigma Aldrich, St Louis, MO E.U.A.) a 37 °C por 30 minutos. A suspensão de células foi filtrada por um filtro de 70 µm (BD Biosciences - San Jose CA E.U.A.) para remover restos de tecido. Então, a colagenase foi inativada com soro fetal bovino (SFB) e a suspensão celular foi lavada com tampão fosfato (PBS) e centrifugada duas vezes por 5 minutos a 260 x g cada vez. O pellet formado foi suspenso em 0,84% NH<sub>4</sub>Cl para remover as células vermelhas do sangue. As células foram lavadas e centrifugadas duas vezes com PBS e cultivadas em garrafas plásticas (TPP, Trasadingen, Suíça) em low-glucose Dulbecco's

modified Eagle's medium (DMEM, Gibco - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA E.U.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone, Termo). As células foram mantidas em cultura por 4 semanas.

#### **4.3. Imunofenotipagem das CTAds**

A suspensão de células-tronco derivadas do tecido adiposo ( $1 \times 10^5$  células) foi incubada por 40 minutos em concentrações saturadas dos anticorpos CD34-FITC, CD105-FITC, CD73-CD45-PE e PerCP e controles de isotipos (todos os anticorpos foram adquiridos da BD PharMingen Biosciences, San Diego, CA, E.U.A.). Após três lavagens, as células foram centrifugadas a 200 x g durante 5 minutos e o pellet resultante foi ressuspenso em tampão fosfato (PBS) gelado. A fluorescência celular foi avaliada com a utilização de citômetro de fluxo (FACSCanto, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, E.U.A.).

#### **4.4. Diferenciação das CTAds**

As CTAds foram diferenciadas em adipócitos pelo tratamento com DMEM low, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e dexametasona ( $1 \mu\text{M}$ ), isobutilmetilxantina ( $0,5 \mu\text{M}$ ), insulina ( $10 \text{ mg/ml}$ ) e indometacina ( $100 \mu\text{M}$ ) por 14 dias. Para a diferenciação em osteoblastos CTAds foram tratadas com DMEM baixa glicose, suplementado com 10% de SFB, dexametasona ( $0,1 \mu\text{M}$ ), ácido ascórbico ( $0,2 \mu\text{M}$ ) e fosfato beta glicerol ( $10\text{mM}$ ) (Sigma, Aldrich, St Louis, USA) por 28 dias.

#### **4.5. Modelo experimental:**

##### **4.5.1. Lesão de isquemia e reperfusão unilateral severa:**

Os animais foram submetidos à anestesia com ketamina-xilasina ( $100\text{mg/Kg}$  de Ketamina,  $10\text{mg/kg}$  de xilasina) (Agribrands do Brasil, São Paulo, Brasil) por via intraperitoneal (ip). Após a exposição do retroperitônio, foi

realizada a isquemia unilateral do rim, em que o pedículo renal esquerdo foi ligado (clampes microvasculares, Rocca, SP) por uma hora. O rim contra-lateral (direito) não foi manipulado. Após este período (1h), os clampes foram retirados e o rim manipulado foi visualizado e massageado até que se observasse a sua total reperfusão. Após esta constatação, as vísceras foram deslocadas de volta à cavidade abdominal e a parede abdominal e o peritônio foram suturados e o animal foi mantido em aquecimento por iluminação indireta até a completa recuperação da anestesia. Em seguida, todos os animais do mesmo grupo foram mantidos no biotério em microisoladores até a realização da eutanásia, a qual foi realizada 24 horas, 6 ou 10 semanas após a cirurgia, de acordo com o protocolo experimental empregado. Nos grupos tratados com CTAds, a administração foi conduzida por via ip em cada animal ( $2.10^5$  células por animal), após 4h de lesão pré-estabelecida.

#### ***4.5.2. Modelo de nefrite túbulo-intersticial:***

Os animais foram alimentados com ração contendo 0,25% de adenina (Rhoister, Aracoiaba da Serra, Brasil) durante 10 dias. Após esse período, os animais sofreram eutanásia via dose letal de anestésico e foi realizada a coleta dos fragmentos renais e sangue. Nos grupos tratados com CTAds, novamente a administração foi conduzida por via ip em cada animal ( $1.10^6$  células por animal) após o primeiro dia de ingestão da ração enriquecida com adenina.

#### ***4.6. Protocolo experimental da IR:***

Para conduzir os experimentos com IR, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

*Grupo Sham 24h:* Camundongos C57Bl/6j fêmeas submetidas apenas a laparotomia, sem manipulação dos rins ou tratamento com CTAd (n=5). A eutanásia foi realizada 24 horas após o procedimento cirúrgico;

Grupo IR unilateral 24h: Camundongos C57Bl/6j fêmeas submetidas ao procedimento cirúrgico e clampeamento do pedículo renal esquerdo por 1h, sem administração de CTAd (n=5). A eutanásia foi realizada 24 horas após o procedimento cirúrgico;

Grupo IR unilateral + CTAd 24h: : Camundongos C57Bl/6j fêmeas submetidas ao procedimento cirúrgico e clampeamento do pedículo renal esquerdo por 1h. Após 4h, as CTAds foram administradas via ip na dose de  $2.10^5$ /animal (n=5). A eutanásia foi realizada 24 horas após o procedimento cirúrgico;

Grupo Sham IR 6 semanas: Camundongos C57Bl/6j fêmeas submetidas apenas a laparotomia, sem manipulação dos rins ou tratamento com CTAd (n=5). A eutanásia foi realizada 6 semanas após o procedimento cirúrgico;

Grupo IR unilateral 6 semanas: Camundongos C57Bl/6j fêmeas submetidas ao procedimento cirúrgico e clampeamento do pedículo renal esquerdo por 1h, sem administração de CTAd (n=5). A eutanásia foi realizada 6 semanas após o procedimento cirúrgico;

Grupo IR unilateral 6 semanas + CTAd: Camundongos C57Bl/6j fêmeas submetidas ao procedimento cirúrgico e clampeamento do pedículo renal esquerdo por 1h. Após 4h, as CTAds foram administradas via ip na dose de  $2.10^5$  /animal (n=5). A eutanásia foi realizada 6 semanas após o procedimento cirúrgico;

Grupo Sham 10 semanas: Camundongos C57Bl/6j fêmeas submetidas apenas a laparotomia, sem manipulação dos rins ou tratamento com CTAd (n=5). A eutanásia foi realizada 10 semanas após o procedimento cirúrgico;

Grupo IR unilateral 10 semanas: Camundongos C57Bl/6j fêmeas submetidas ao procedimento cirúrgico e clampeamento do pedículo renal

esquerdo por 1h, sem administração de CTAds (n=5). A eutanásia foi realizada 10 semanas após o procedimento cirúrgico e

Grupo IR 10 semanas unilateral + CTAd: Camundongos C57Bl/6j fêmeas submetidas ao procedimento cirúrgico e clampeamento do pedículo renal esquerdo por 1h. Após 6 semanas, as CTAds foram administradas via ip na dose de  $2.10^5$  /animal (n=5). A eutanásia foi realizada 10 semanas após o procedimento cirúrgico.

#### **4.7. Protocolo experimental NTI:**

Para avaliar o efeito do tratamento das CTAd na NTI, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo NTI Sham: Camundongos C57Bl/6j fêmeas com ingestão de ração normal (n=5). A eutanásia foi realizada 10 dias após o início do protocolo;

Grupo NTI Adenina: Camundongos C57Bl/6j fêmeas com ingestão de ração enriquecida com 0,25% de adenina (n=5). A eutanásia foi realizada 10 dias após o início do protocolo;

Grupo NTI Adenina + CTAd: Camundongos C57Bl/6j fêmeas com ingestão de ração enriquecida com 0,25% de adenina (n=5). Após um dia do início da ingestão da ração com adenina os animais receberam tratamento com CTAds na dose  $1.10^6$  / animal. A eutanásia foi realizada 10 dias após o início do protocolo.

#### **Parâmetros estudados:**

##### **4.8. Avaliação da função renal:**

**4.8.1. Dosagem de Creatinina Sérica:** Por overdose de anestésico, os animais foram sacrificados e o sangue coletado. As amostras foram submetidas à determinação de creatinina para análise funcional pelo kit de Creatinina da Labtest (Labtest, São Paulo, Brasil).

**4.8.2 Dosagem de Uréia Sérica:** O plasma coletado foi submetido à determinação de uréia para análise funcional pelo kit de Uréia da Labtest (São Paulo, Brasil).

**4.9. Análise Morfológica:**

Os rins dos animais sacrificados na sexta e décima semana pós-isquemia foram analisados pelas colorações de Masson e Picro Sirius. Para os exames histológicos, os rins foram fixados em formol tamponado 10% por 24h, lavados com etanol 70% por 24h e em seguida, embebidos em parafina. Os cortes histológicos apresentavam uma espessura de 4 µm. Para avaliar o grau de expansão do interstício renal, a fração do córtex renal ocupado por tecido intersticial corado positivamente para componentes da matriz extracelular (colágeno) foi avaliada quantitativamente por Masson por meio da contagem de pontos consecutivos em campos microscópicos, com um aumento final de 100 x em uma grade de 176 pontos. A avaliação por picrosírius foi medida com uma ampliação de 20 x usando o NIS programa de Elementos de microscopia Nikon, com pelo menos 20 campos consecutivos. A quantificação da necrose tubular aguda (NTA) foi avaliada em cortes de rim corados com eosina hematoxilina por um patologista especialista nesta área.

**4.10. Análise dos transcritos gênicos:**

Amostras de tecido renal foram analisadas quanto à presença de transcritos gênicos de HPRT (controle de presença e qualidade de mRNA), de Colágeno-1 e 4, BMP-7, VEGF, iNOS, CTGF e TGFb, além de algumas citocinas como IL1b, IL-4, IL-6 e IL-10. Os fragmentos do rim foram retirados em técnica asséptica com animais sob anestesia com Ketamina-Xilazina. Para a retirada dos rins, foi realizada a incisão xifopubiana mediana, seguida da exposição dos rins

após rebaterem-se as vísceras abdominais para o tórax. Um fragmento do rim foi retirado (aproximadamente 100mg), colocado em tubo de poliestireno de 1,5 ml (EPPENDORF®) e, imediatamente, congelado em nitrogênio líquido. A seguir, as amostras foram homogeneizadas e manipuladas segundo o método de extração de RNA total TRizol® (Invitrogen).

#### **4.11. Extração e purificação de RNA total - método TRizol®:**

O rim congelado em N<sub>2</sub>(l) (aproximadamente 50 mg) foi triturado com o auxílio do homogenizador POLYTRON® (Kinematica, Luzern, Alemanha) e ressuspendido em 1 ml de TRizol (Invitrogen, EUA). O método utiliza solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato que lisa e dissolve componentes celulares mantendo a integridade do RNA. Às amostras de tecido renal dissolvidas em Trizol®, foi adicionado clorofórmio (MERCK) (0,2 ml de clorofórmio/1ml de TRizol®) e centrifugadas a 4°C, 12000g para a obtenção de duas fases, uma orgânica e outra aquosa, onde encontramos todo o conteúdo de RNA. O RNA total foi reconstituído através da adição de isopropanol (MERCK) (0,5 ml de isopropanol/1ml de TRizol®) seguida de centrifugação 12000g. Após o isolamento, o RNA foi lavado com etanol a 75% (MERCK) (1 ml de etanol/1 ml de TRizol®) e novamente centrifugado a 10500g. O pellet contendo a fração de RNA foi ressuspendido em água bidestilada livre de RNase e DNase (GIBCO). Após esta etapa, o RNA foi diluído e quantificado, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop (ND-1000 UV-Vis). Amostras de RNA somente foram usadas quando as relações de comprimentos de onda de 260/280nm e 260/230 foram acima de 1,8. O RNA total foi estocado a -80°C até o uso.

#### **4.12. Síntese do DNA complementar (cDNA):**

A partir do RNAm purificado preparamos o cDNA utilizando-se 2 µg deste RNA total (com volume máximo de 19 µl). Em um tubo EPPENDORF® acrescentou-se 2,4 µl de 10x Dnase I Reaction e 1µl de Dnase I (Invitrogen, EUA) e elevou-se o volume a 23 µl com água DEPC. A reação foi incubada por 15 minutos a 25°C. Para inibir a ação da Dnase I, adicionou-se 1 µl de solução de EGTA (Promega, Madison, EUA) juntamente com o Oligo dT (Invitrogen, EUA) e foi incubado por 10 minutos a 65°C. Na fase de linearização da cadeia, o RNA foi transferido para o gelo, e este foi incubado por 5 minutos. Para a reação de transcrição reversa, utilizamos uma solução contendo 10 µl de 5X “*First Strand Buffer*” (Promega), 1µl de “BSA – bovine serum albumin” (Promega), 10µl de desoxibonucleotídeo (dNTP) – (Promega), com 10 mM de cada base (A, T, C, G). Esta mistura foi adicionada ao tubo EPPENDORF® contendo a amostra de RNA, a qual foi incubada. Ao final do processo, adicionamos a este tubo 2 µl de M-MLV Reverse Transcriptase (200U/µ) (Promega), e incubamos a 37°C por 60 minutos, depois a 65°C por 10 minutos e as amostras foram mantidas a 4°C até uso.

#### **4.13. Reação de PCR em tempo real:**

O nível de expressão gênica das amostras entre os grupos foi mensurado pela técnica de RT-PCR em tempo real utilizando dois sistemas distintos. O primeiro consiste no sistema TaqMan e o segundo no método SYBER Green. Para amplificar os transcritos gênicos, foi utilizado primers TaqMan sendo as sondas pré-sintetizadas específicas para cada gene (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Por outro lado para o sistema SYBER Green, os primers foram projetados baseando-se na sequência conhecida de bases nitrogenadas descritas no GenBank, sendo posteriormente adequados pelo programa Primer Express

da Applied Biosystems para adapta-los à técnica de PCR em tempo real. Cada reação foi realizada em triplicata com volume final de 10 µl. Para reações nas quais utilizamos primers TaqMan, adicionamos 5 µl de TaqMan Master Mix, 0,5 µl de primer, 1 µl de cDNA completando com água até 10 µl. Para as reações do tipo SYBR Green, utilizamos o mesmo protocolo apenas substituindo o reagente TaqMan master Mix pelo SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Reino Unido), sendo que neste caso, as condições de amplificação foram previamente padronizadas para cada transcrito. Em cada ensaio, foram utilizados controles negativos (H<sub>2</sub>O ao invés de cDNA). A reação foi realizada em aparelho *ABI Prism 7300 sequence detection system* (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA). As amostras foram executadas em triplicata para demonstrar a reprodutibilidade das curvas de amplificação. Para as reações de real time PCR o gene endógeno utilizado foi o HPRT. A curva de dissociação dos produtos amplificados para a determinação da temperatura de “melting” dos mesmos e avaliação da qualidade da amostra, foi realizada para todos os genes em que foi utilizado o sistema SYBER green. Finalmente, os resultados foram analisados pelo método URE da quantificação relativa<sup>107</sup> utilizando o software SDS (APPLIED Biosystems) e a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . A lista dos genes e a sequência dos iniciadores utilizados neste trabalho encontra-se disponível na tabela abaixo:

**Tabela 1.** Tabela representativa dos genes e seus correspondentes iniciadores usados para análise de expressão gênica no modelo proposto.

Gene	Sistema	Sequência
HPRT	<i>Taq-Man</i>	Mm00446968_m1
Col-1	<i>Taq-Man</i>	Mm00801666_g1
CTGF	<i>Taq-Man</i>	Mm01192931_g1
IL-1 $\beta$	<i>Taq-Man</i>	Mm01336189_m1
IL-4	<i>Taq-Man</i>	Mm00445259_m1
IL-6	<i>Taq-Man</i>	Mm00561420_m1
IL-10	<i>Taq-Man</i>	Mm00439616_m1
iNOS	<i>Taq-Man</i>	Mm01309902_m1
HO-1	<i>Taq-Man</i>	Mm00516004_m1
Sry	<i>Taq-Man</i>	Mm00441712_s1
TNF- $\alpha$	<i>Taq-Man</i>	Mm00443258_m1
VEGF	<i>Taq-Man</i>	Mm01281449-m1
Vimentina	<i>Taq-Man</i>	Mm00449201_m1
HPRT	<i>SYBER Green</i>	F 5'-CTCATGGACTGATTAACATGGGGAC-3' R 5'-GCAGGTCAGCAAAGATATACTAGCC-3'
BMP-7	<i>SYBER Green</i>	F 5'-ATTAGACTTCCACCCTCGATACC-3' R 5'-TCC TTA TAG ATC CTG TCG AAT GCT-3'
TGF- $\beta$	<i>SYBER Green</i>	F 5'-AACTATTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3' R 5'-GTTGGCATGGTAGCCCTTG-3'

#### 4.14. Bioplex:

O kit Bio-Plex de ensaio de camundongo com 23 Plex de citocinas (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, E.U.A.) foi utilizado para avaliar nas amostras de todos os grupos a presença de 23 citocinas. O ensaio foi lido sobre o sistema de matriz Bio-Plex suspensão, e os dados foram analisados utilizando Bio-Plex software Manager 4.0. Curvas Standard que variavam de 32,000 a 1,95 pg / mL foram utilizadas.

#### 4.15. Imunohistoquímica:

A marcação para colágeno tipo I (diluído 1:200; COL-1, Abcam, Cambridge, MA, E.U.A.), FSP-1 (diluído 1:400, S100A4, DAKO), PCNA (diluído 1:300; clone PC10, DAKO), e Hypoxyprobe (diluído 1:500; 121 turnpike

Middlesex, Burlington, MA E.U.A.) foram realizados em cortes histológicos fixados em parafina. Para tanto, as lâminas foram desparafinizadas, reidratadas e submetidos à solução de recuperação antigênica Tris-EDTA pH 9 a 95°C. Para Hypoxyprobe, a recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato 10 mM pH 6 a 55°C. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 3%, com posterior bloqueio com *Protein Block Solution* (DAKO, Carpinteria, CA, EUA). Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário ou reagente controle negativo, seguido de incubações sequenciais de 30 minutos em temperatura ambiente utilizando o kit Envision (DAKO). A coloração foi completada por uma incubação 1-3 minutos com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) + substrato cromógeno, o que resultou em um precipitado de cor castanha no local do antígeno. A contra-coloração com hematoxilina também foi realizada para todas as laminas. Para a análise da hipóxia tecidual, foi administrado por via intraperitoneal Hypoxyprobe TM\_1 (pimonidazole HCl), na dose de 60 mg/kg de peso corporal no tempo de aproximadamente 25 minutos antes do sacrifício. Após a inoculação, a sonda Hypoxyprobe TM\_1 (121 turnpike Middlesex, Burlington, MA E.U.A.) foi distribuída para todos os tecidos, porém aderiu-se apenas em determinadas proteínas cuja célula têm uma concentração de oxigênio inferior a 14  $\mu\text{M}$  - o equivalente a uma pressão parcial de  $\text{O}_2$  igual 10 mmHg a 37 ° C.

#### **4.16. Análise estatística:**

Os dados foram coletados, analisados e comparados com auxílio de estatística descritiva clássica. Como forma de inferência estatística foi utilizada métodos analíticos de natureza paramétrica. Dessa forma, os testes utilizados para comparação de duas médias foram o Teste-T de *Student* e para comparações envolvendo mais de duas amostras independentes foram

utilizados os testes de *one way ANOVA*, seguido de pos teste de Tukey. Os resultados foram apresentados com média + desvio padrão, para variáveis paramétricas, e sob a forma de mediana e faixa de variação para variáveis não paramétricas. As diferenças foram consideradas significantes quando o valor de p for menor que 0,05. A análise estatística, os gráficos e as tabelas utilizados neste trabalho foram realizados com o auxílio dos softwares *Microsoft Office Excel 2010* (Microsoft, EUA) e *graphPad Prism* para plataforma Windows.

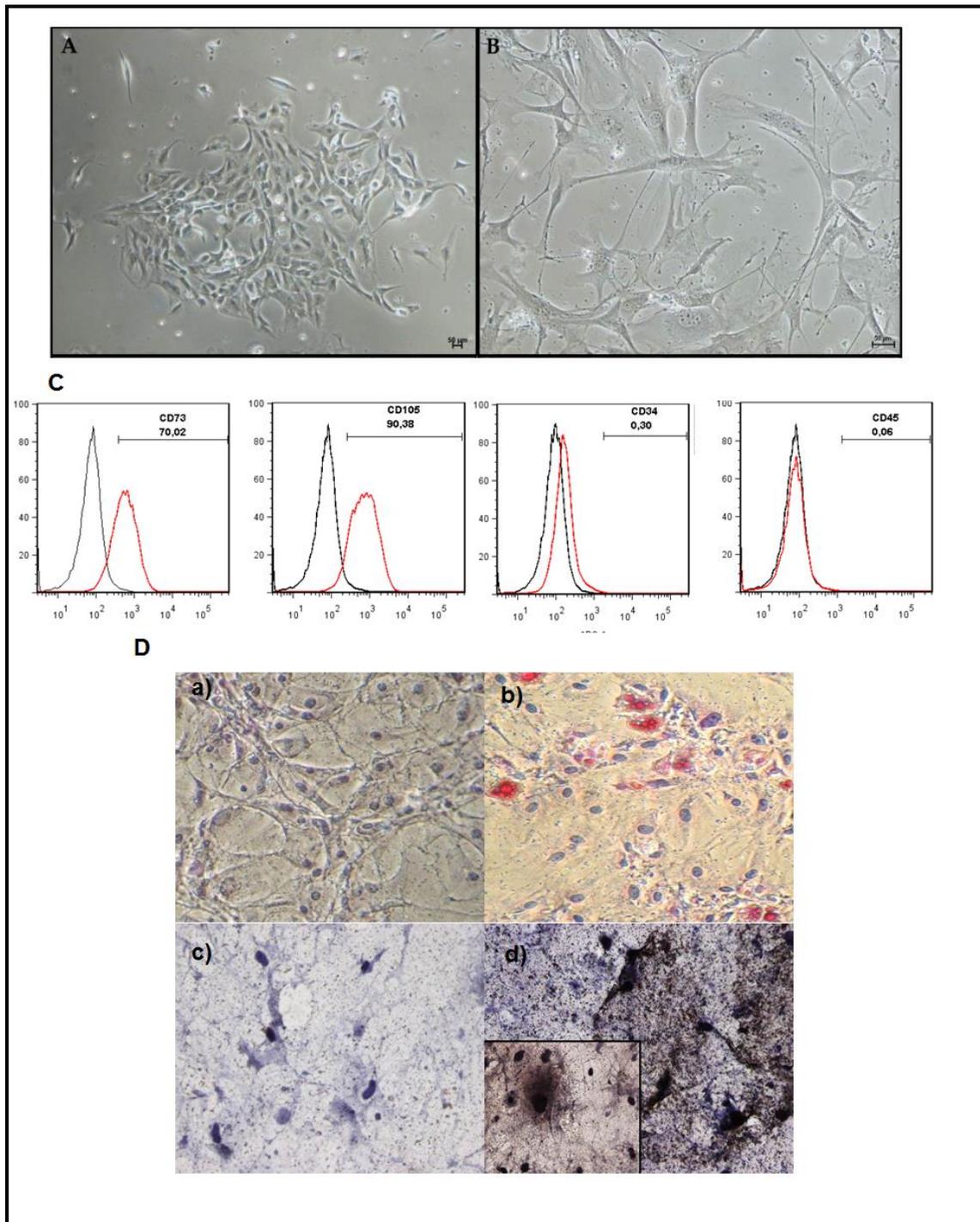
---

## **5. RESULTADOS:**

### **5.1. Isolamento e caracterização das CTAds**

Antes de realizarmos os ensaios de tratamento, a nossa população de CTAds foi caracterizada. As CTAds foram obtidas do tecido adiposo (gordura inguinal) de camundongos C57Bl/6j e submetidas ao processo de cultura. Primeiramente as CTAds apresentaram a propriedade de aderência ao plástico, a qual é considerada uma habilidade característica de CTMs. Posteriormente, foi possível identificar a presença de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-Fs), sendo que essas células também apresentaram um formato fibroblastóide típico de CTMs, com a presença de um citoplasma amplo de limites imprecisos e com longas projeções citoplasmáticas visualizadas por microscopia de contraste de fase (Figura 5 A).

As CTAds também foram caracterizadas por imunofenotipagem e por ensaios de diferenciação celular. A imunofenotipagem foi realizada usando alguns marcadores de superfície celular descritos previamente na literatura<sup>68</sup> como: CD34, CD73, CD105 e CD45. A expressão de CD73 foi de 70,02%, CD105: 90,38% CD34: 0,30%, CD45: 0,06%. Esses resultados demonstra que nossas CTAds possuem um fenótipo característico de CTMs. Na caracterização por diferenciação, as CTAds em primeira passagem foram caracterizadas por diferenciação em adipócitos e osteócitos por ensaios independentes. Nas células diferenciadas para adipócitos pôde-se visualizar em vermelho gotículas de lipídios no interior das células coradas com *Oil Red*. Na diferenciação para osteócito foi observado depósitos de cálcio, após 28 dias de incubação, através da coloração de Von Kossa (Figura 5D). Caracterizando dessa forma a habilidade das CTAds em diferenciar em linhagens mesenquimais.

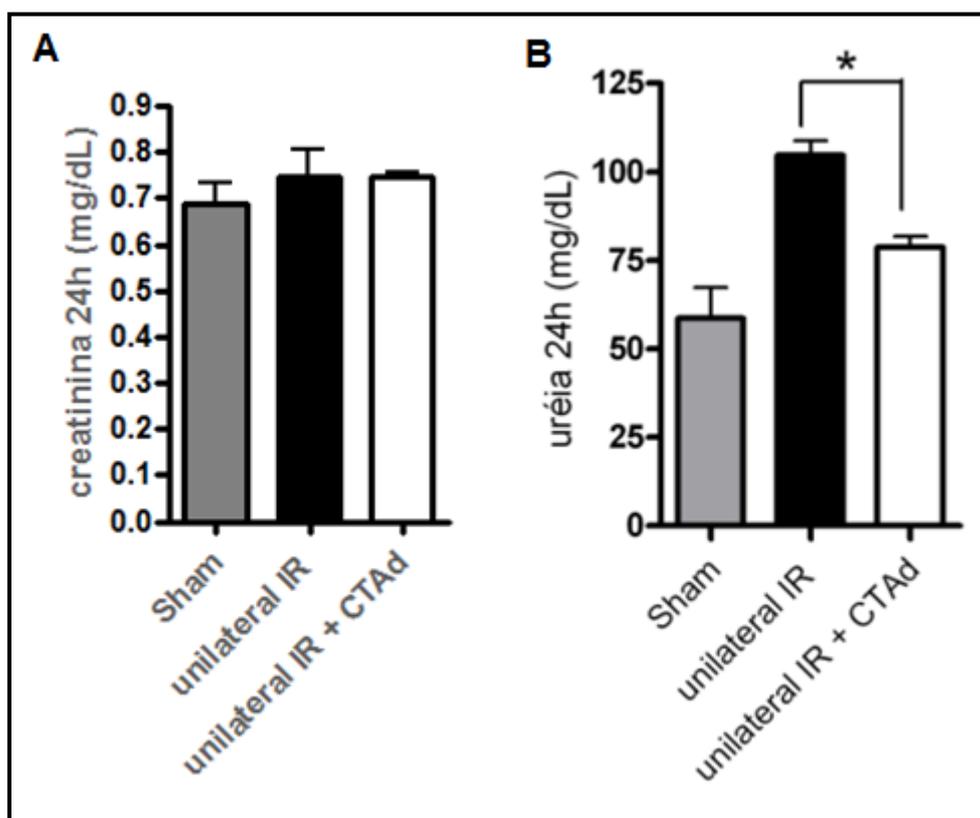


**Figura 5: Caracterização morfológica, imunofenotípica e por diferenciação das CTAd derivadas de camundongos C57BL/6.** (A) Unidades formadoras de colônias (CFU-Fs) visualizada em culturas iniciais de CTMs-C57BL/6 (aumento x 100); (B) Morfologia fibroblastóide por microscopia de contraste de fase das CTMs-C57BL/6 (aumento x 200); (C) análise da expressão de CD105(PE); CD73(PE); CD34 (FITC); e CD45(PerCP). As células foram incubadas com os anticorpos conjugados com FITC, PE ou PerCP, e analisados no FASCanto (BD); (D) diferenciação das CTAd em adipócito e osteócito: em **b**), vemos a diferenciação das CTAd em adipócitos, em vermelho moléculas lipídicas coradas com Oil Re,; **a**) é seu respectivo controle; Em **d**), vemos a diferenciação das CTAd em osteócitos, cuja diferenciação pode ser visualizada através da coloração de Von Kossa, **c**) é seu respectivo controle.

## 5.2. Modelo de IR

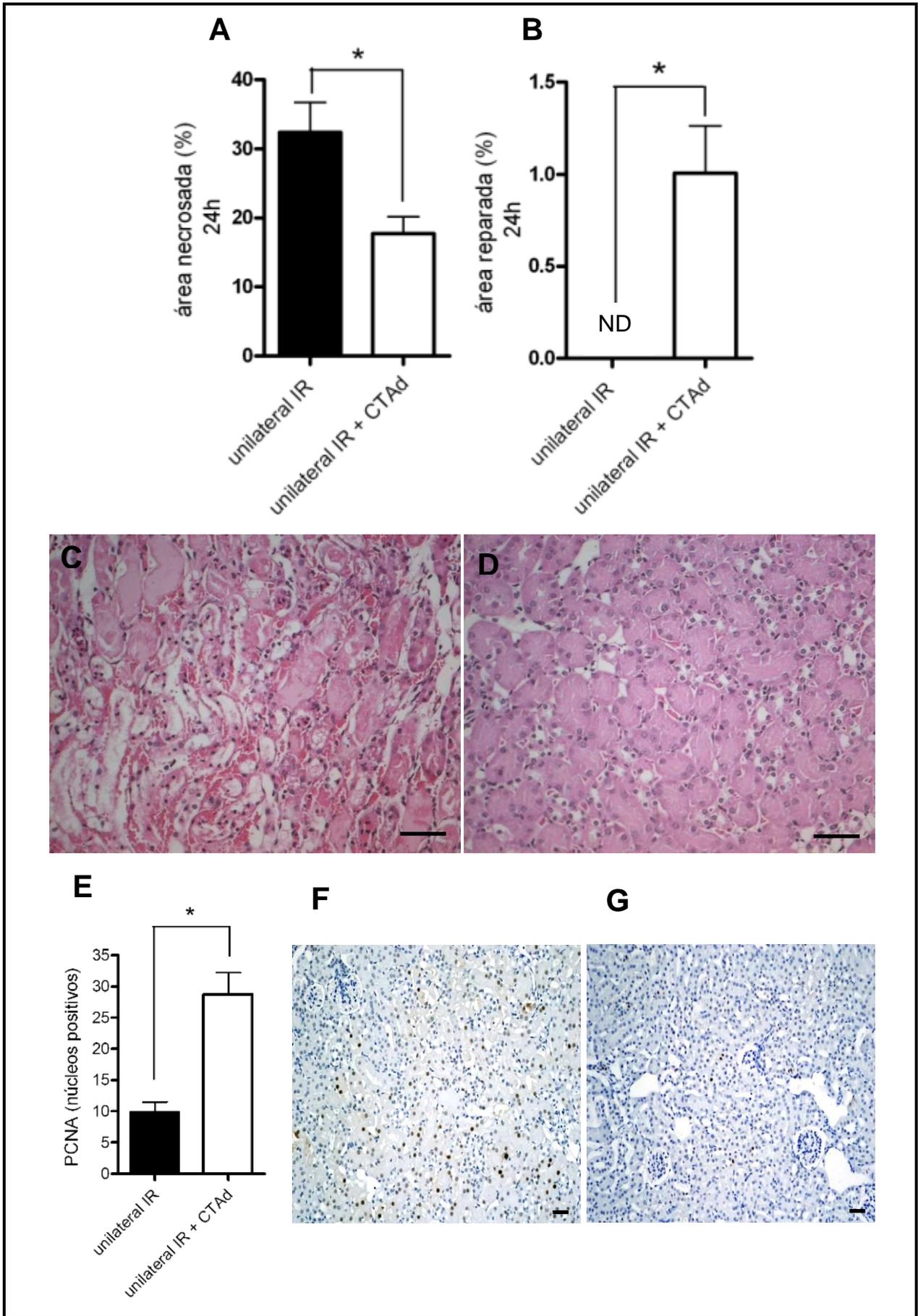
### 5.2.1. Tratamento com CTAd leva a uma imunomodulação tecidual e sistêmica

No modelo de IR grave apenas um dos rins sofre a lesão, no entanto, devido ao longo tempo de isquemia (1 hora) os parâmetros funcionais renais são alterados. Embora nenhuma diferença tem sido encontrada nos níveis de creatinina sérica, os níveis séricos de uréia apresentaram-se aumentados nos animais submetidos a IR severa quando comparados aos animais sham. Já o tratamento com CTAd proporcionou menores níveis de uréia em relação aos animais com IR mas sem tratamento, representando dessa forma um menor acometimento renal (Figura 6A e 6B).



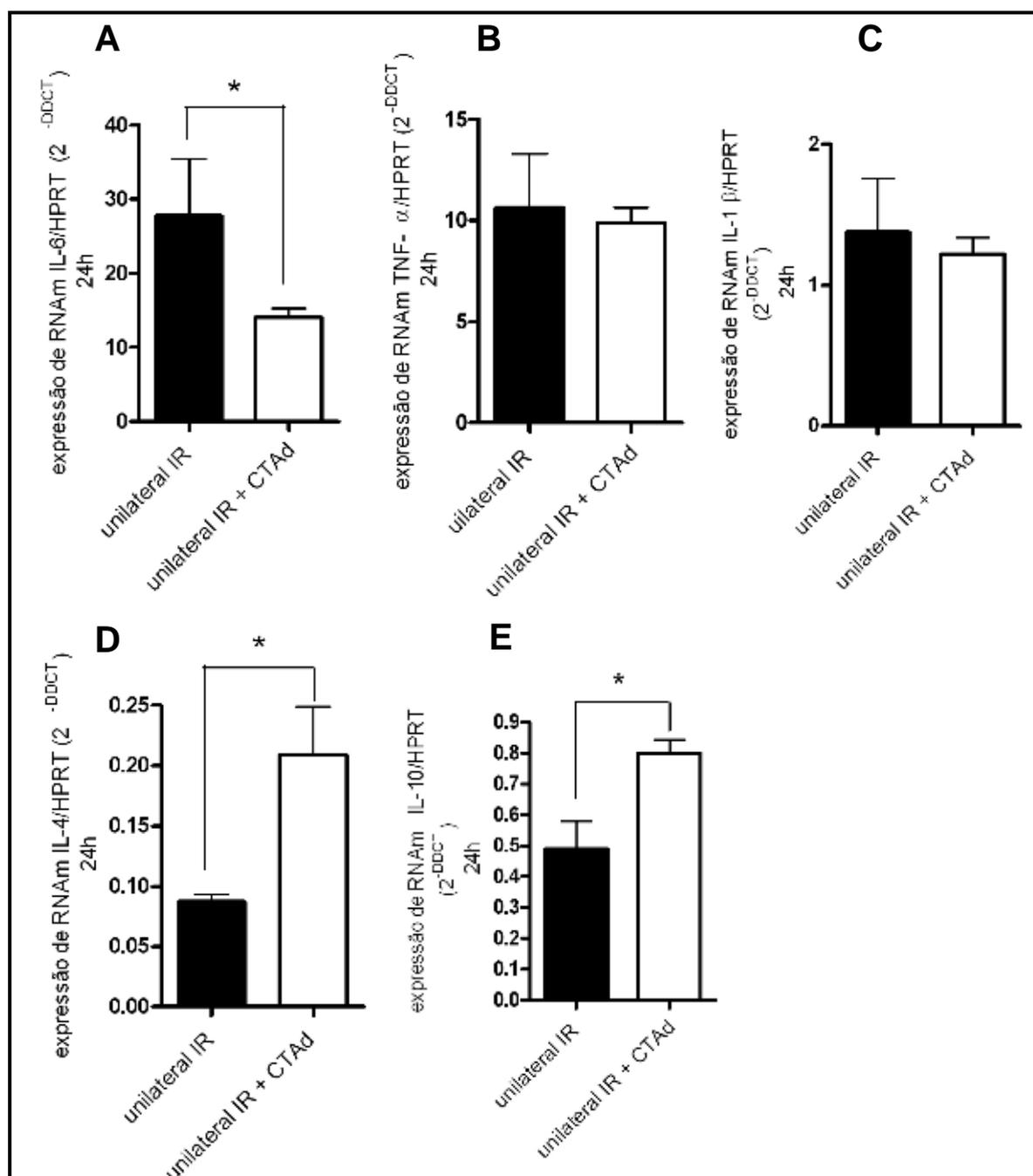
**Figura 6: Parâmetros funcionais renais após 24 horas de IR.** (A) níveis séricos de creatinina. (B) níveis de uréia. Os valores mostrados são média aritmética  $\pm$  desvio padrão dos grupos de animais: Sham (n=5), IR (n=5) e IR + CTAd (n=5). (\*p<0,05).

Essa melhora funcional foi correlacionada com a avaliação *in situ* do índice de NTA. Os rins submetidos à isquemia após 24 horas apresentaram maior área de necrose (Figura 7A), enquanto que esse parâmetro diminuiu nos animais tratados com CTAds. De forma adicional, o padrão de regeneração também foi superior em animais tratados com CTAds (Figuras 7B, 7C e 7D), como demonstrado no score histopatológico e pela marcação de PCNA (Figuras 7 E-G).



**Figura 7: Análise histomorfométrica do tecido renal após 24h de isquemia unilateral. (A)** área de necrose nos rins. **(B)** área regenerada no rim. **(C)** imagem representativa da área de necrose tubular aguda em animais não tratados **(D)** tratados com CTAd (aumento de 40x). **(E)** Quantificação de PCNA. Núcleos marcados positivamente para PCNA são mais freqüentes nos animais tratados, provavelmente devido a eventos regenerativos. **(F)** imagem representativa de PCNA em animal tratados com CTAd e **(G)** não tratados (aumento de 20x). (todos os grupos n=5) (\* p <0,05).

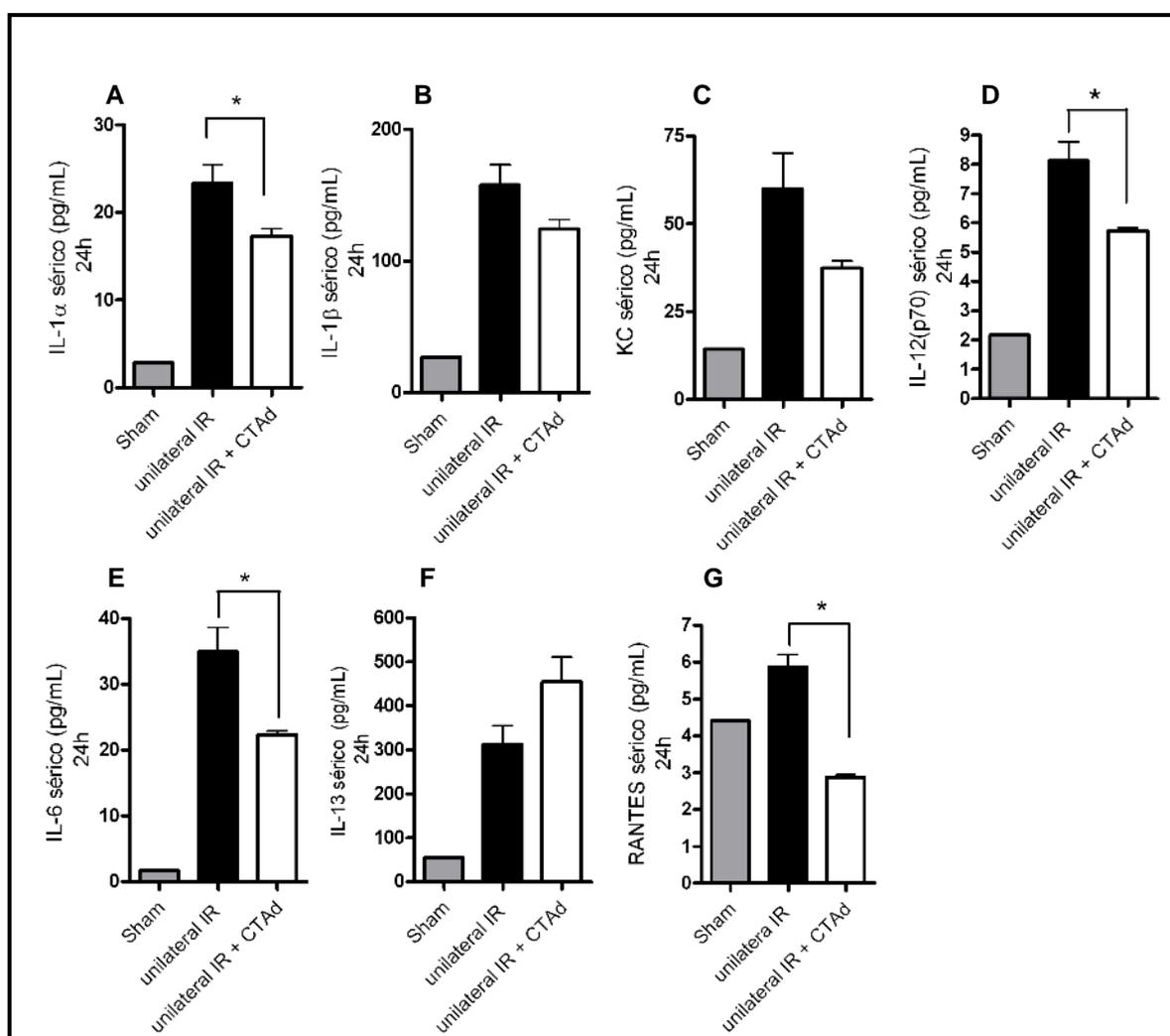
A inflamação tem um importante papel amplificador durante o processo de isquemia e reperfusão renal. Adicionalmente, é conhecido que CTAds desempenham um substancial papel imunorregulador. Nesse sentido, analisamos a expressão do RNAm de diversas citocinas inflamatórias após o tratamento com CTAd. A expressão de RNAm de IL-6 estava reduzida no tecido renal de animais tratados com CTAd (Figura 8A). Por outro lado, a expressão dos RNAm para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  apresentaram uma tendência de redução no grupo tratado, mas não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 8B e 8C). Surpreendentemente, a expressão de RNAm de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10, estavam aumentados no tecido renal dos animais tratados com CTAds (Figura 8D e 8E).



**Figura 8: Efeito imunomodulatório no tecido renal após a administração de CTAds com 24h de isquemia unilateral. (A)** expressão de RNAm de IL-6. **(B)** expressão de RNAm de TNF- $\alpha$ . **(C)** expressão de RNAm de IL-1 $\beta$ . **(D)** expressão de RNAm de IL-4. **(E)** expressão de RNAm de IL-10. Resultados de qRT-PCR são expressos em média de  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm DP$ ; (todos os grupos n=5) (\* p < 0,05).

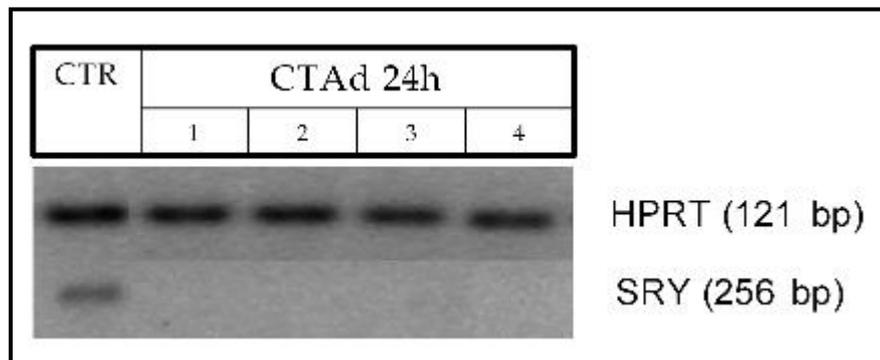
Sistemicamente, encontramos o mesmo padrão imunomodulatório encontrado no tecido renal. As citocinas séricas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\alpha$ , IL-6 e IL-12 (p70) foram reduzidas no grupo de animais tratados com CTAds

(Figura 9A, 9D, 9E). Os níveis de IL-1 $\beta$ , KC e IL-13 também foram avaliados, mas não foram observadas diferenças significantes (Figura 9B, 9C e 9F). Quando avaliamos os níveis de RANTES, também observamos uma redução nos animais tratados com CTAds (Figura 9G). Neste ensaio global de análises de citocinas os níveis das moléculas G-CSF, GM-CSF, IL-12 (p40), MCP-1, MIP-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  não diferiram entre os animais tratados e não tratados com CTAds. Por fim, também neste ensaio, a expressão de IL-12, IL-3, IL-4, IL10, IL-17, MIP-1 $\alpha$  e IFN $\gamma$  não foram detectados.



**Figura 9: Efeito sistêmico na modulação de citocinas após a administração de CTAds com 24h de isquemia unilateral. (A) IL-1 $\alpha$ . (B) IL-1 $\beta$ . (C) KC. (D) IL-12 (p70). (E) IL-6. (F) IL-13. (G) RANTES.** Resultados de qRT-PCR são expressos em média de  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm DP$ ; \*  $p < 0,05$ .  $n=5$  Abreviaturas: CTAd: células-tronco derivadas do tecido adiposo; IL: interleucina;

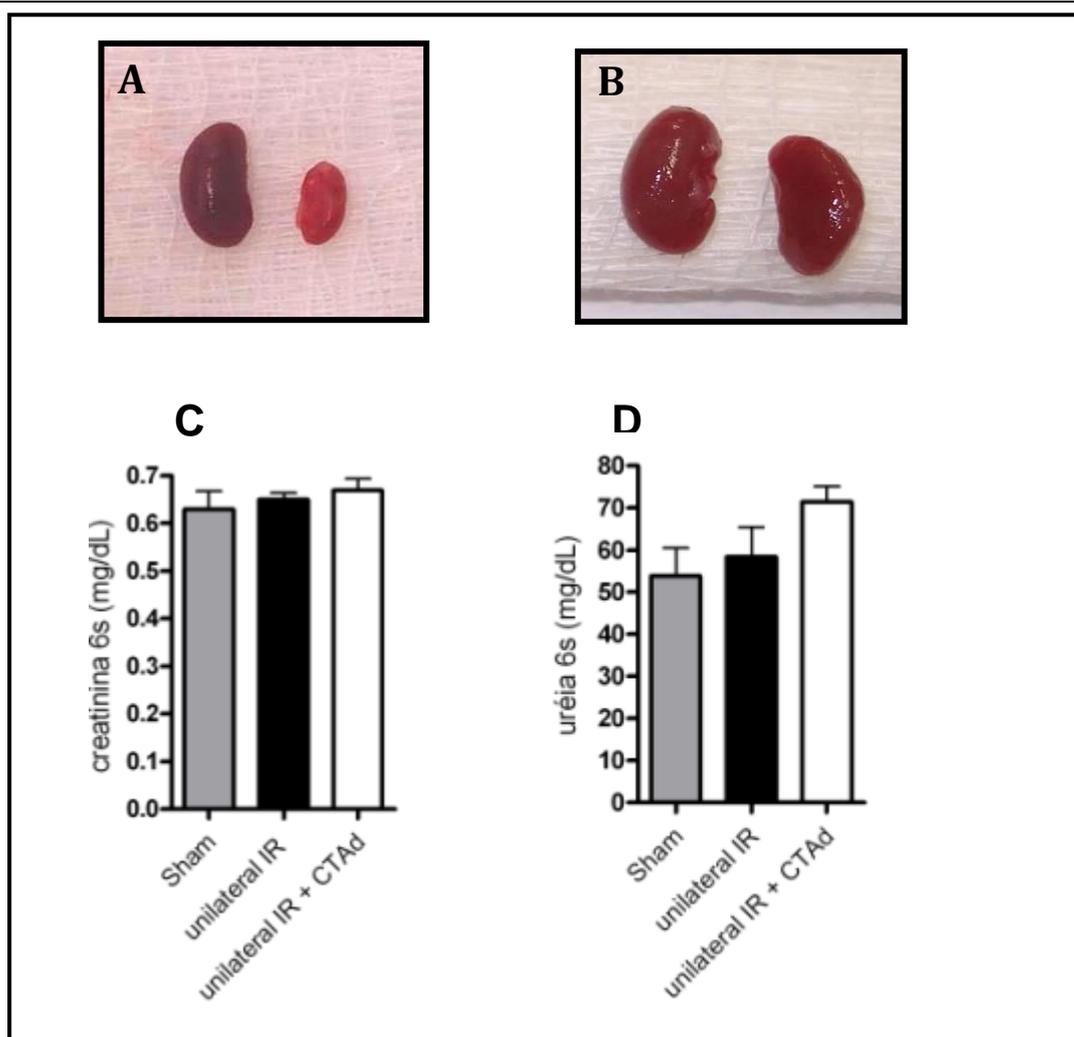
Com o intuito de verificar a presença das CTAds dentro dos rins após o tratamento, a expressão do RNAm do gene específico para o cromossomo masculino murino (SRY) foi amplificado por PCR em tempo real (Figura 10). Não foi detectado intensidades de RNAm de SRY, indicando a ausência dessas células dentro do tecido renal, durante o tempo observado.



**Figura 10: Análise da possível presença de CTAd no tecido renal após 24h de isquemia unilateral.** Analisamos a expressão de SRY por real time PCR nos rins dos animais tratados com CTAD. (n=4) .

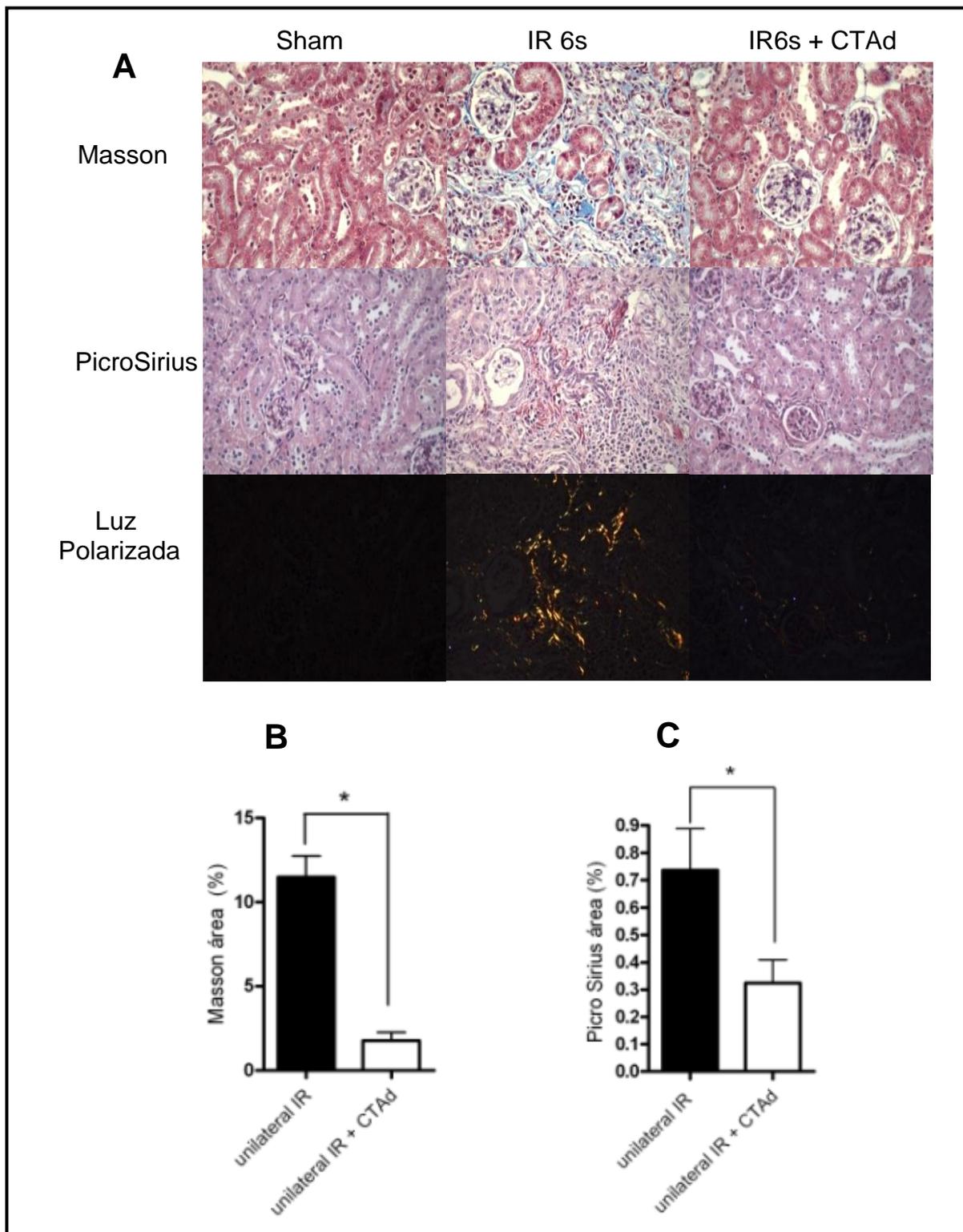
### ***5.2.2. CTAds interrompe a progressão da fibrose decorrente de isquemia severa***

No modelo de IR com 6 semanas, observou-se que o rim submetido à isquemia estava menor quando comparado ao rim contra-lateral de animais não tratados. Surpreendentemente, o rim isquêmico dos animais tratados com CTAds não se apresentava reduzido (Figura 11A e 11B). Entretanto, apesar da evidente proteção, não observamos alterações no nível de creatinina e uréia após o tratamento com CTAds. Isto sugere que provavelmente o rim contralateral, gradualmente, compensou a perda funcional do rim lesado (Figura 11C e 11D).



**Figura 11: Visualização e análise funcional dos rins de animais tratados e não tratados com CTAds após 6 semanas de isquemia unilateral. (A)** necropsia do rim após IR unilateral em 6 semanas. O rim direito submetido à isquemia severa unilateral (IR) está menor quando comparado ao rim contralateral, não sujeito a IR; **(B)** rins dos animais tratados com CTAD, em que não houve diferença no tamanho do rim. **(C)** níveis séricos de creatinina. **(D)** níveis de uréia. (Para todos os grupos n=5).

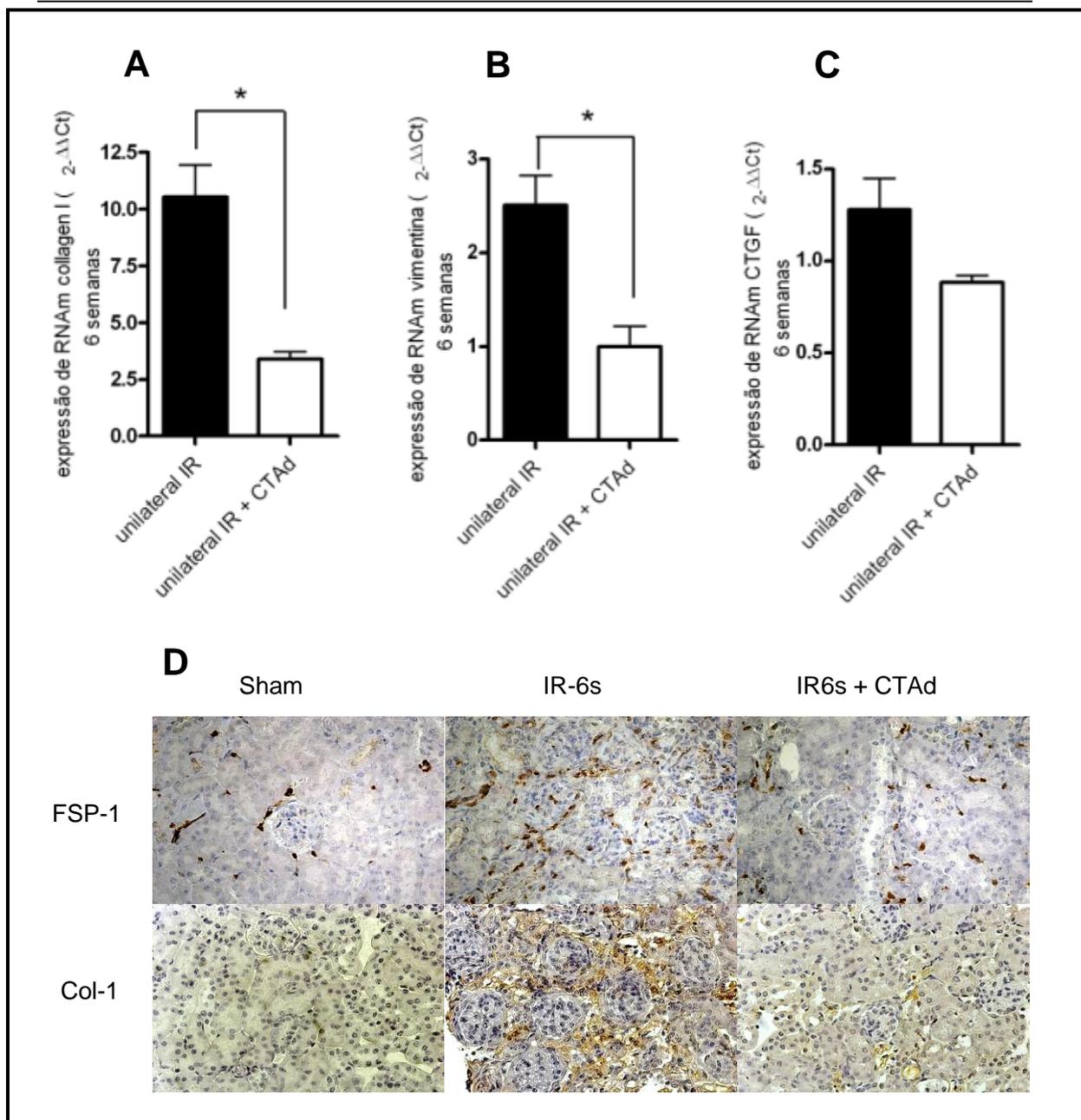
De forma complementar avaliamos no rim com tamanho reduzido, uma maior área de fibrose, como demonstrado pelas colorações com Tricrômico de Masson e Picrosírius (Figura 12A, 12B e 12C). Por outro lado, nenhuma evidência de fibrose foi observada no grupo sham.



**Figura 12: Análise de Fibrose por coloração de Tricômio de Masson e Picro Sírius em animais tratados e não tratados com CTAd após 6 semanas de isquemia unilateral. (A)** imagem representativa dos rins dos animais sham (Sham), não tratados (IR 6s) e tratados com CTAd (IR 6s + CTAd) corados com tricrômico de Masson e Picrosirius, respectivamente. Análise de Picrosirius sob luz polarizada, onde se observa apenas moléculas de colágeno tipo I. **(B)** Quantificação do tricrômico de Masson, e **(C)** de picrosirius. Picrosirius e Masson foram quantificados pela análise de imagem usando o NIS Elements (Nikon), no entanto, Picrosirius utilizando luz

polarizada. (Aumento de 40 x). Para todos os grupos,  $n > 5$ , \*  $p < 0,05$ . Aos resultados são apresentados com valores médios  $\pm$  DP.

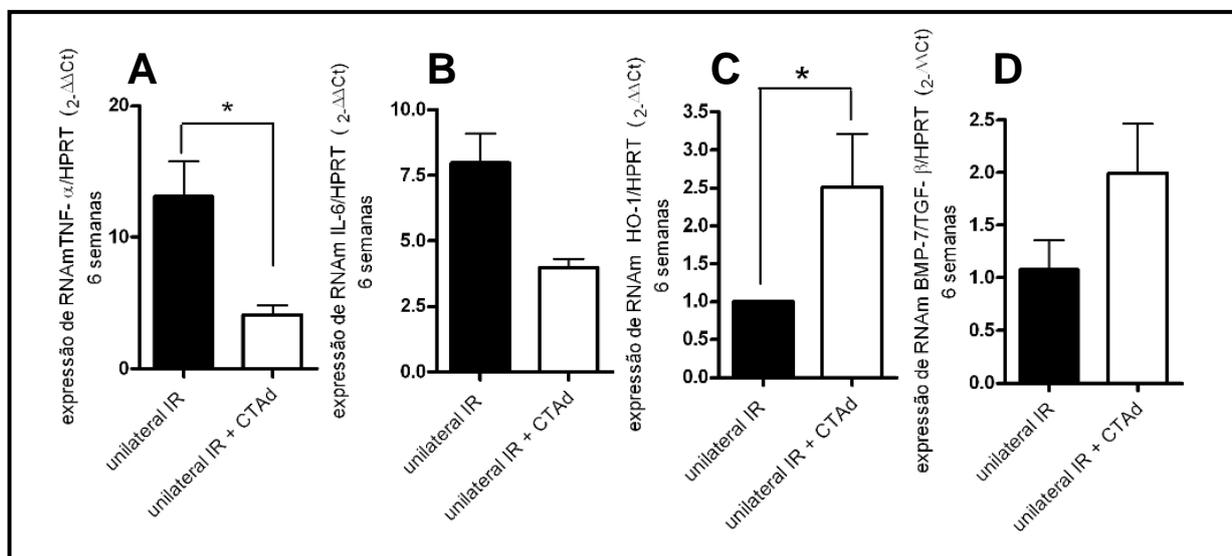
Na tentativa de elucidar o possível mecanismo envolvido, avaliamos também a expressão do RNAm de algumas moléculas pró-fibróticas. Observamos uma reduzida expressão de RNAm para colágeno do tipo 1 (Col-1), vimentina e CTGF no tecido renal após 6 semanas de IR em animais tratados com CTAds (Figuras 13A, 13B e 13C). Complementarmente, verificamos que a expressão proteica *in situ* para marcadores de fibrose como FSP-1 (proteína específica de fibroblastos 1) e colágeno tipo I (Figura 13D) foi maior no grupo de animais que não receberam tratamento, sugerindo a ocorrência de uma maior população de fibroblastos e uma maior deposição de matriz extracelular.



**Figura 13: Expressão de mRNA e moléculas pró-fibróticas em tecido renal de animais tratados e não tratados com CTAd com 6 semanas após a reperfusão.** Expressão gênica em rins de animais tratados e não tratados com CTAd após lesão de isquemia e reperfusão, gerados em referência a HPRT como controle interno. **(A)** expressão de RNAm de Colágeno tipo I, **(B)** expressão de RNAm de Vimentina, **(C)** expressão de RNAm de CTGF, **(D)** Imagem representativa ilustrando expressão protéica de FSP-1 e Colágeno tipo 1 no tecido renal após seis semanas (aumento de 40 x). Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP,  $n = 5$  animais/grupo. Dados expressos como média  $\pm$  SD de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . \*,  $P < 0,05$ .

### 5.2.3. Imunomodulação da inflamação pelas CTAdS

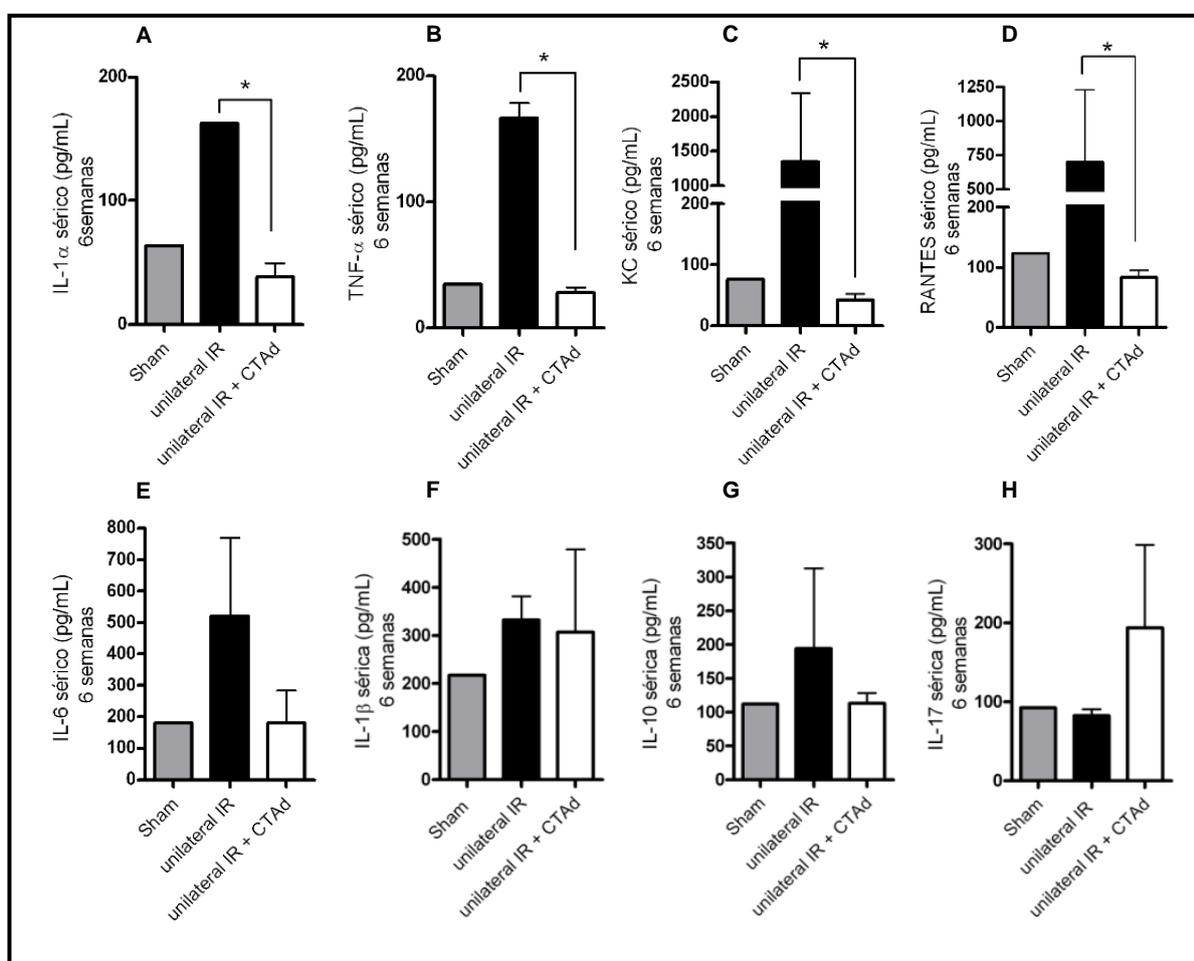
Inicialmente verificamos, após 24 horas de IR grave, uma importante modulação da resposta inflamatória nos animais tratados com CTAdS. Para compreendermos como a redução da inflamação no estágio inicial da IR, poderia correlacionar com a progressão da fibrose, nos intrigou investigar o padrão inflamatório tanto em nível tecidual quanto sistêmico em animais com 6 semanas de IR após o tratamento com CTAdS. De forma adicional, avaliamos o nível de expressão de algumas moléculas renoprotetoras e pró-angiogênicas relacionadas com a reparação tecidual. Após 6 semanas de IR, a expressão no rim de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, ainda estavam reduzidas nos animais tratados com CTAdS (Figuras 14A e 14B). De forma interessante, a expressão de HO-1 e a razão BMP-7/TGF $\beta$  estavam aumentados nos animais tratados com CTAdS, em comparação aos animais não tratados (Figuras 14C e 14D).



**Figura 14: Expressão de citocinas e moléculas renoprotetoras em tecido renal de animais tratados ou não com CTAdS e sacrificados 6 semanas após a reperfunção.** Expressão gênica em rins de animais tratados com CTAd e não tratados após lesão de isquemia e reperfunção, gerados em referência a HPRT como controle interno. **(A)** expressão de RNAm de TNF- $\alpha$ , **(B)** expressão de RNAm de IL-6; **(C)** expressão de RNAm de HO-1; **(D)** expressão de RNAm de BMP-7/TGF- $\beta$ . Os dados

estão expressos como média  $\pm$  DP, n = 5 animais / grupo. Dados expressos como média  $\pm$  SD de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . \*, P < 0,05.

A terapia com CTAds também conduziu a um estado de imunomodulação sistêmica. Níveis séricos de citocinas foram reduzidos em animais tratados com CTAds. As moléculas pró-inflamatórias como IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , KC e RANTES foram significativamente reduzidos nos animais tratados, quando comparados com animais não tratados (Figura 15A - D). IL-6 e outras citocinas (IL-1 $\beta$  e IL-10 e IL-17) não diferiram entre os grupos, embora uma tendência de redução nos animais tratados com CTAds tenha sido observada (Figura 15E - H).

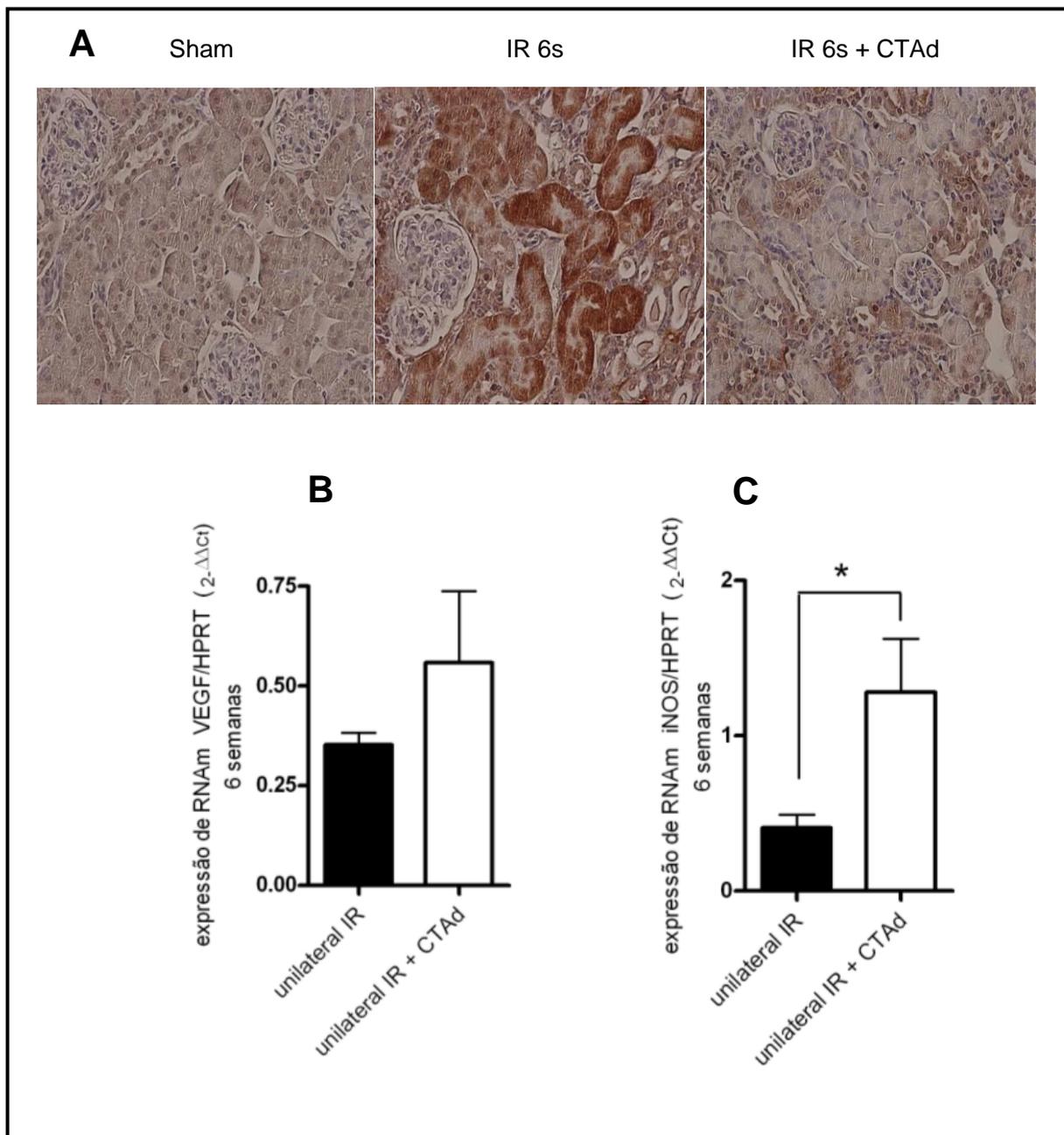


**Figura 15: Expressão global de citocinas em soro renal dos animais tratados e não tratados com CTAds e sacrificados com 6 semanas após a reperfusão.** Os níveis de citocinas para: (A) IL1- $\alpha$ , (B) TNF- $\alpha$ , (C) KC, (D) RANTES, (E) Il-6, (F) IL-1 $\beta$ , (G) IL-10 e (H) IL-17 foram determinadas em animais sham, animais submetidos isquemia-reperfusão unilateral (IR) e animais submetidos à lesão

IR unilateral tratados com CTAd; Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP, n = 5 animais / grupo. \*, P < 0,05. Dados expressos como média  $\pm$  SD de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .

#### **5.2.4. Efeito protetor das CTAds contra Hipóxia Crônica**

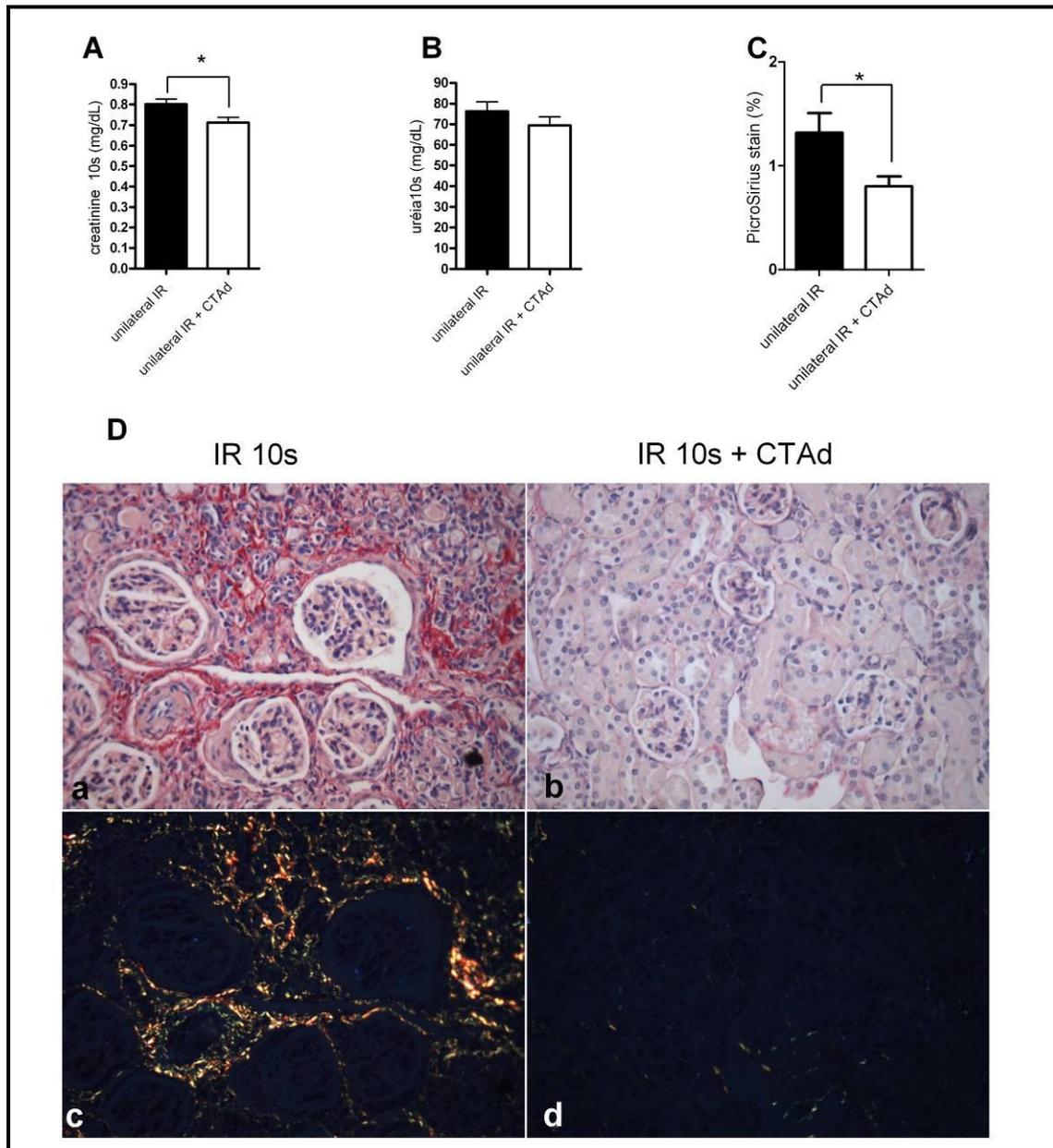
A hipóxia crônica, devido à rarefação dos capilares peritubulares, é uma possível explicação para a contínua progressão da fibrose renal, uma vez que baixa pressão de oxigênio é um fator importante para o desencadeamento da TEM. Dessa forma, analisamos se a hipóxia tecidual foi reduzida no tecido renal, utilizando uma sonda que detecta áreas mais baixas de pressão de O<sub>2</sub>. Por este método o rim isquemiado dos animais tratados com CTAds demonstrou menores áreas correspondentes a hipóxia (Figura 16A). A expressão de RNAm de iNOS, uma importante molécula co-ativadora, também estava aumentada nos rins dos animais tratados com CTAds. Foi observado ainda uma tendência de aumento de expressão de moléculas pró-angiogênicas como VEGF (Figura 16B e 16C). A alta expressão dessas moléculas nos animais tratados com CTAds pode levar a uma maior vascularização do tecido renal, principalmente por decorrência das propriedades pró-angiogênicas das CTAds.



**Figura 16: Imunohistoquímica de Hypoxyprobe e análise de moléculas angiogênicas em tecido renal de animais tratados e não tratados com CTAd com 6 semanas após a reperfusão.** Expressão gênica em rins de animais tratados com CTAd e não tratados após lesão de isquemia e reperfusão, gerados em referência a HPRT como controle interno. **(A)** imagem representativa ilustrando imuno-histoquímica de Hypoxyprobe no tecido renal após seis semanas (aumento 40 x). **(B)** expressão de RNAm de VEGF e **(C)** expressão de RNAm de iNOS no rim após seis semanas. Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP, n = 5 animais / grupo. \*, P < 0,05. Dados expressos como média  $\pm$  SD de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Abreviaturas: CTAd, células-tronco derivadas de tecido adiposo; iNOS, óxido nítrico sintase; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular.

#### **5.2.5. Reversão da fibrose renal após tratamento com CTAds**

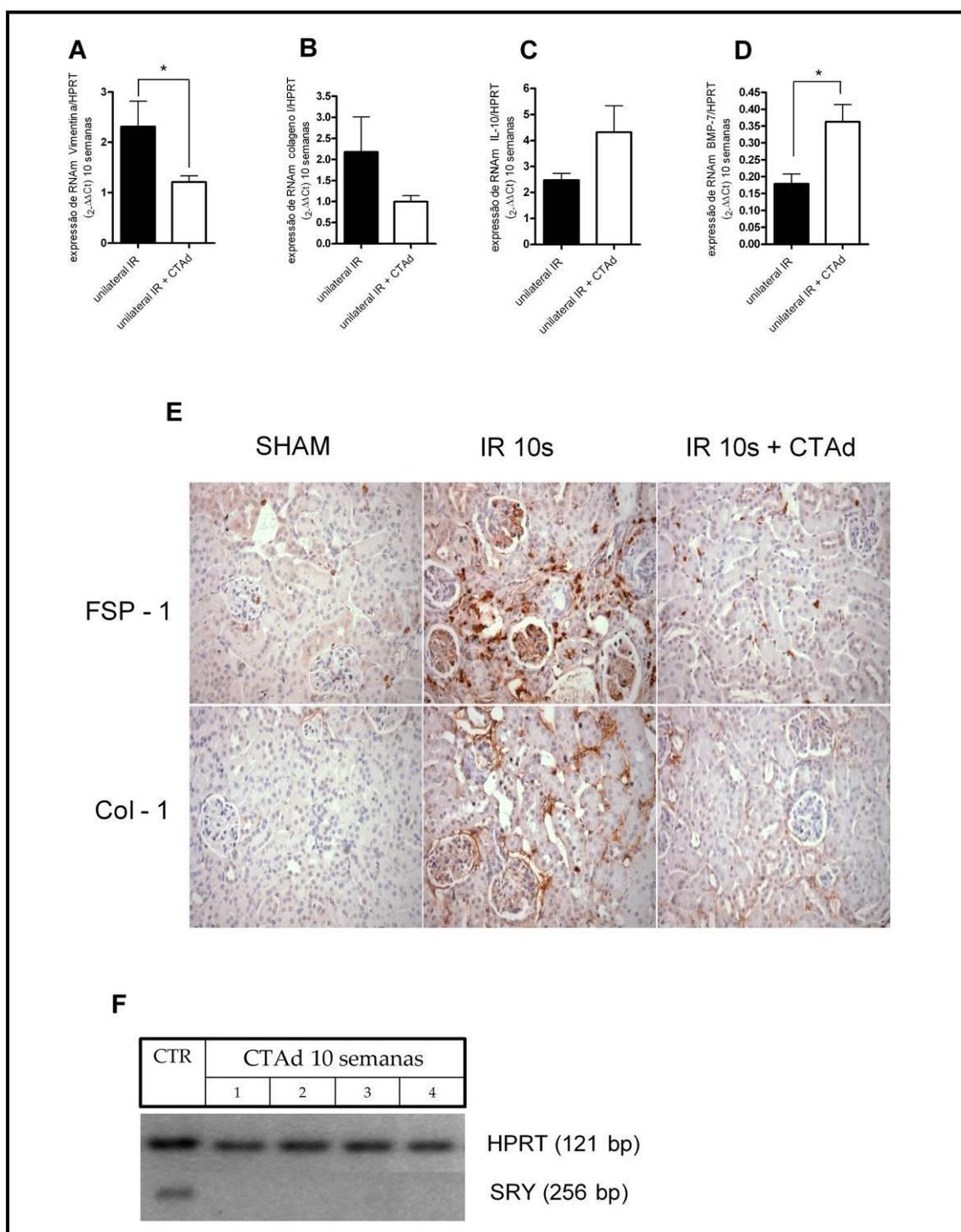
Após avaliarmos a proteção das CTAds na redução da fibrose tecidual, como próximo passo, testamos o papel do tratamento com CTAds na reversão do quadro fibrótico pré-estabelecido. As CTAds foram administradas 6 semanas após a IR, e os animais foram observados até a décima semana de seguimento. Surpreendentemente, o rim dos animais tratados com CTAds mostrou reduzidas áreas de fibrose, como analisado pela coloração de Picrosírius (Figura 17C e 17D). Uma consistente melhora funcional também foi observada, correlacionando-se com a redução dessas áreas de fibrose (Figura 17 A e 17B).



**Figura 17: Efeitos da administração de CTAds na 6<sup>a</sup> semana após IR, e sacrifício após 10 semanas.** (A) níveis séricos de creatinina, (B) níveis séricos de uréia. (C) quantificação de picrosirius pela análise de imagem usando NIS Elements (Nikon). Para todos os grupos,  $n > 5$ , \*  $p < 0,05$ . (D) imagem representativa dos rins dos animais não tratados (IR 10s) (a, c) e tratados com CTAd (IR 10s + CTAd), (b, d) corados com picrosirius. Painéis superiores (a, b), mostrando forte coloração vermelha e painéis inferiores (c, d) mostram a mesma imagem com luz polarizada (aumento de 40 x), onde se observa apenas moléculas de colágeno tipo I.

Para confirmarmos o fenômeno de reversão fibrótica, avaliamos também a expressão de RNAm para vimentina e evidenciamos uma notável redução nos animais tratados com CTAds quando comparadas com o grupo não tratado (Figura 18A). A expressão de RNAm de colágeno tipo I também estava

diminuído nos animais tratados com CTAds, no entanto, não foi observado diferença significativa (Figura 18B). Adicionalmente, a avaliação *in situ* para colágeno tipo I e FSP-1 correlacionaram-se com os dados de expressão gênica, demonstrando uma regulação negativa do mecanismo de fibrose tecidual (Figura 18E). A expressão de mRNA de citocinas renoprotetoras como IL-10 e BMP-7 aumentaram após o tratamento com CTAds (Figura 18C e 18D). Novamente como observado com 6 semanas após IR, na análise de 10 semanas, não foi possível identificar a expressão do RNAm de SRY, apesar de uma melhora funcional e histopatológica ter sido evidenciada (Figura 18F).



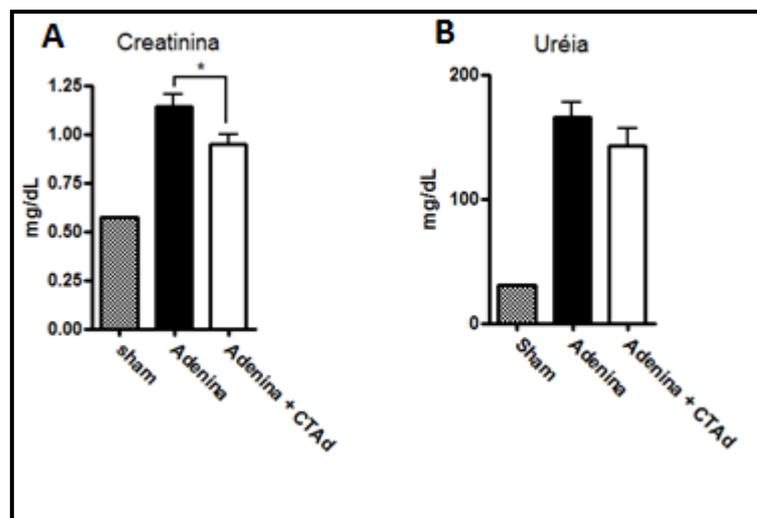
**Figura 18: Expressão de citocinas em tecido renal dos animais tratados e não tratados com CTAds com 10 semanas após a reperusão.** Expressão gênica em rins de animais tratados com CTAds e não tratados após lesão de isquemia e reperusão, gerados em referência a HPRT como controle interno. (A) expressão de RNAm de Vimentina e (B) expressão de RNAm de Col-1, sendo fatores prófibróticos. (C) expressão de RNAm de IL-10, e (D), expressão de RNAm de BMP-7, fatores protetores. (E) imagem representativa da imunohistoquímica de FSP-1 e Col-1 no tecido renal após 10 semanas (aumento de 40 x). (F) a expressão qualitativa de SRY por PCR nos rins dos animais tratados com CTAds. Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP, n = 5 animais / grupo. \* P < 0,05.

### 5.3. Modelo de NTI

#### 5.3.1 Tratamento com CTAd em modelo de nefrite túbulo-intersticial:

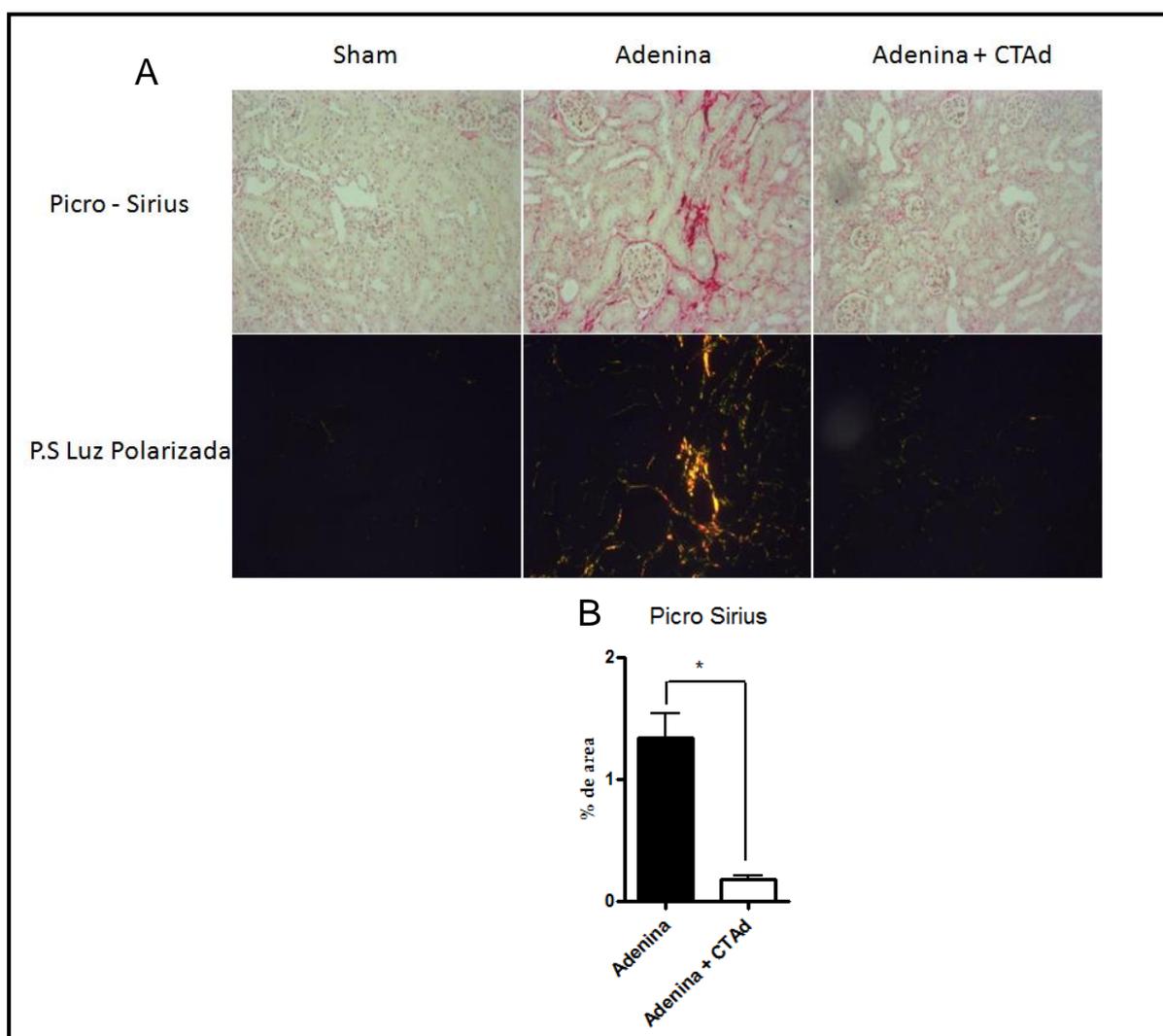
Após avaliarmos o caráter renoprotetor das CTAds em um modelo de IR, fomos verificar se esta proteção se reproduzia num modelo experimental de NTI, uma vez que em ambas possuem um caráter inflamatório, o qual parece fundamental para formação do quadro de fibrose tecidual seguida de redução da função renal.

Observamos neste modelo uma melhora nos parâmetros funcionais pós-tratamento com CTAds. Os animais que receberam intraperitonealmente as CTAds, apresentaram uma redução nos níveis de uréia e significativa redução dos níveis de creatinina séricas, (Figura 19A e 19B). Visualmente estes animais também apresentaram se mais ativos em relação aos não tratados (dados não apresentados).



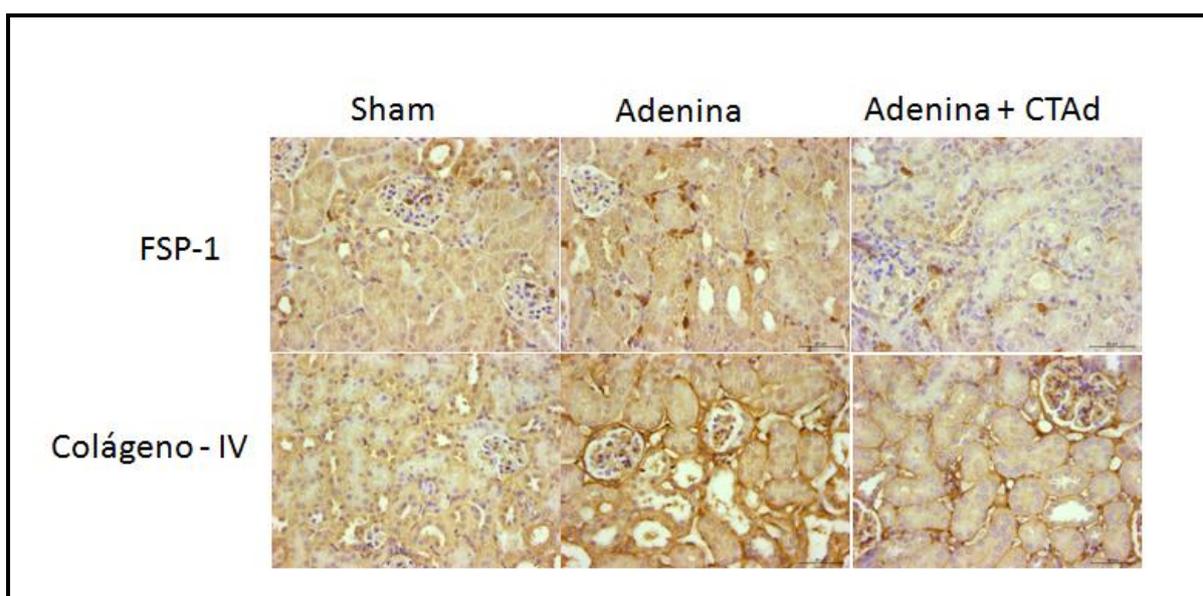
**Figura 19: Níveis de Creatinina e Uréia Sérica após tratamento com ração enriquecida com adenina e CTAds.** Os valores mostrados são média aritméticas  $\pm$  desvio padrão dos grupos de animais: Sham (n=3), Adenina (n=5) e Adenina + CTAd (n=6). (\*  $p < 0,05$ ). Aos resultados são apresentados com valores médios  $\pm$  DP.

É conhecido que durante a manifestação da NTI ocorre um envolvimento do processo inflamatório no interstício renal acometendo os túbulos, causando um edema intersticial e lesão tubular. Dessa forma, a persistência do agente agressor em conjunto com a manutenção da inflamação, resulta na formação de fibrose intersticial e atrofia tubular. Desse modo, após verificarmos a melhora da função renal nos animais tratados com CTAds, fomos analisar histologicamente o tecido renal quanto a formação de fibrose. Observamos uma menor área fibrótica nos animais que receberam as CTAds, evidenciado principalmente pela análise da coloração de Picrosírius por luz polarizada (Figura 20). Como esperado, nenhum grau de fibrose relevante foi observado no grupo sham.



**Figura 20: Análise de Fibrose por coloração de Picro Sírius no modelo de NTI.** imagem representativa dos rins dos animais sham (Sham), tratados com adenina e tratados com adenina + CTAd corados com Picrosirius. Análise de Picrosirius sob luz polarizada, onde se observa apenas moléculas de colágeno. Quantificação foi realizada pela análise de imagem usando o NIS Elements (Nikon), utilizando luz polarizada. (Aumento de 40 x). Para todos os grupos,  $n > 5$ , \*  $p < 0,05$ . Aos resultados são apresentados com valores médios  $\pm$  DP.

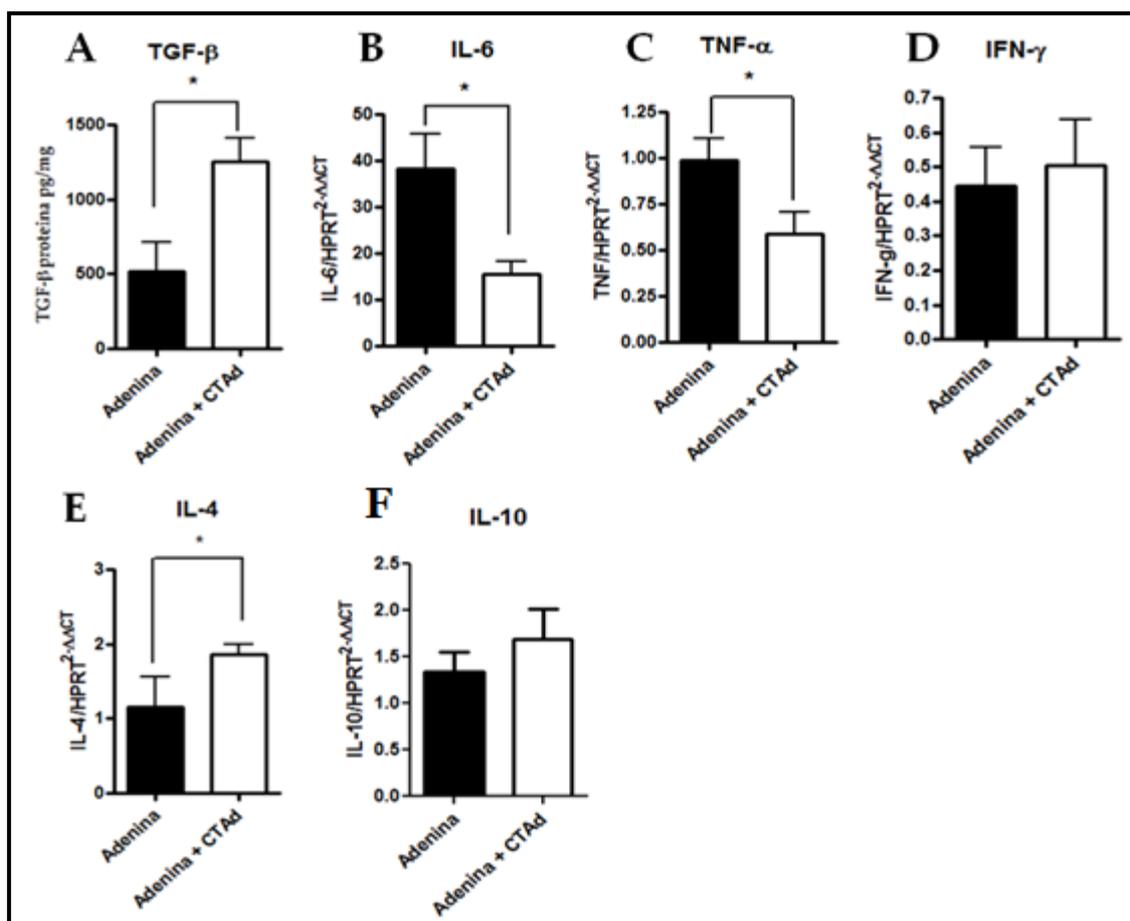
Para confirmar nosso achado, análises de expressão de proteínas foram realizadas através de ensaios de imunohistoquímica (IHQ) para FSP-1 (proteína específica de fibroblastos 1) e colágeno tipo IV (Figura 21). Em ambas as análises houve uma menor expressão dessas moléculas nos animais tratados com CTAds.



**Figura 21: Expressão de moléculas Fibróticas em tecido renal dos animais tratados ou não com CTAd no modelo de NTI.** Imagem representativa ilustrando expressão protéica de FSP-1 e Colágeno tipo IV. (aumento de 40x).

Como anteriormente mencionado, a NTI evolui para um estado de fibrose no interstício renal principalmente pela manutenção do quadro inflamatório e ação de moléculas pró-fibrótica como o TGF- $\beta$ . Tendo em vista o caráter imunomodulador das CTAds, fomos avaliar o padrão de moléculas inflamatórias e fibróticas expressas no tecido renal desses animais submetidos ao modelo de

NTI e tratados com CTAd. Após o tratamento com as CTAds, apesar de encontrarmos no tecido renal uma maior expressão proteica de TGF- $\beta$ , verificamos uma modulação da inflamação, com menor expressão de RNAm de moléculas inflamatórias padrão do tipo Th1 (IL-6 e TNF $\alpha$ ) e maior expressão de moléculas anti-inflamatórias padrão do tipo Th2 (IL-4 e IL-10) (Figura 22). Em relação à expressão de IFN-g, a mesma também foi analisada, mas não foi observada diferença estatística entre os grupos.



**Figura 22: Efeito imunomodulatório no tecido renal da administração de CTAd no modelo de NTI.** Tecido renal foi coletado e utilizado para medir a expressão de RNAm. (A) expressão proteica de TGF- $\beta$  em tecido renal; (B) expressão de RNAm de IL-6. (C) expressão de RNAm de TNF- $\alpha$ . (D) expressão de RNAm de IFN gama, (E) expressão de RNAm de IL-4. (F) expressão de RNAm de IL-10. Resultados de qRT-PCR são expressos em média de  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm DP$ ; \* p < 0,05. n=5.

## **6. DISCUSSÃO:**

O potencial terapêutico das CTMs tem sido extensivamente investigado usando modelos animais de doença renal. De forma interessante, apesar de diversos estudos terem estabelecido o papel das CTMs em preservar a integridade do parênquima renal após danos agudos, melhorando sua função e regenerando o epitélio tubular e a capilaridade peri-tubular, os mecanismos por trás desse reparo ainda não estão claramente comprovados. É conhecido que as CTMs possuem a capacidade de migrar até o local de lesão, e atuam diminuindo o estresse oxidativo, o processo inflamatório e a morte celular, e aumentando a angiogênese tecidual.<sup>65,108-111</sup>

Neste estudo, avaliamos a capacidade das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTAds) em diminuir a progressão da doença renal, particularmente pela sua característica imunomoduladora, uma vez que a inflamação é o principal fator envolvido na progressão das doenças renais crônicas. Nesse sentido, utilizamos dois modelos experimentais, um de isquemia e reperfusão renal severa unilateral (IR) e outro de nefrite túbulo-intersticial (NTI), onde em ambos avaliamos a diminuição de progressão da doença renal de um estágio agudo para um estágio crônico.

Estudos experimentais neste âmbito são extremamente importantes, uma vez que hoje cerca de 13% da população mundial apresenta algum grau de DRC, sendo 45% do total de mortes atribuídas a doenças fibróticas.<sup>109,112</sup> Com o envelhecimento da população estes números tendem a subir, aumentando ainda mais a importância destes estudos.

Nossa hipótese consiste no fato de que as CTAd poderiam modular o quadro inflamatório inicial levando a uma inibição do processos de

TEM/TEndM, os quais são considerados uns dos principais eventos responsáveis pela aquisição da fibrose renal.<sup>44,51</sup>

No nosso trabalho, encontramos indícios de que isso realmente poderia estar acontecendo. Os resultados aqui propostos demonstraram tanto no modelo de IR quanto no de NTI a ocorrência de uma melhora da função renal após o tratamento com CTAds seguido de uma diminuição do quadro inflamatório. Esta imunomodulação sistêmica encontrada na lesão aguda no modelo de IR 24h proporcionou após 6 semanas um remodelamento na composição dos tecidos renais onde foi possível constatar menor área fibrótica, a qual também foi evidenciada no modelo de NTI.

A possível associação entre o processo inflamatório e o estabelecimento do quadro fibrótico já foi evidenciado em outros trabalhos do nosso grupo onde foi demonstrado que após uma LRA, seja por isquemia renal severa<sup>113</sup> ou por uma dieta rica em adenina<sup>114</sup>, um processo inflamatório é instalado proporcionando o desenvolvimento de um quadro de fibrose renal. Nesses trabalhos fica clara a ocorrência e manutenção de um processo inflamatório após o insulto renal isquêmico. Entretanto, aqui verificamos que os animais tratados com as CTAds sofreram uma intensa redução do quadro inflamatório inicial. Isso foi evidenciado no modelo de IR 24h, onde encontramos um efeito imunomodulatório pós-terapia com CTAds, com diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, de padrão TH1 (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , KC, RANTES, TNF- $\alpha$  e IL-12) e aumento de expressão de citocinas protetoras, de padrão TH2 (IL-4 e IL-10). A expressão renal destas citocinas no modelo de NTI também seguiu o mesmo padrão, onde esta modulação refletiu em uma melhora nos parâmetros histológicos e funcionais nos rins. Dentre os fatores modulados pela ação das CTAd, o aumento de IL-10 pode estar diretamente ligado a melhora

---

funcional e histológica renal. Estudos experimentais de DRC demonstraram que ratos com aumento crônico de IL-10 apresentavam supressão de infiltrado de células inflamatórias, diminuição de produção de MCP-1 e RANTES, como observado também em nosso modelo, e uma significativa redução de expressão de colágeno tipo I e III, além de apresentar baixos níveis de proteinúria e diminuição significativa de glomeruloesclerose e fibrose intersticial.<sup>115</sup>

Uma vez constatado o efeito imunomodulador das CTAds, tentamos detectar a presença dessas células no tecido renal, porém não obtemos sucesso. Acreditamos que o efeito imunomodulador das células-tronco acontece através de um efeito predominantemente parácrino, através de um fenômeno chamado *touch and go*, em que essas células são atraídas para a área de lesão, secretam fatores imunorreguladores e depois deixam o tecido e/ou sofrem apoptose.<sup>116</sup> Reis e colaboradores utilizando um modelo de LRA induzido por gentamicina encontraram o mesmo efeito protetor das CTMs, com melhora dos parâmetros funcionais, redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6) e aumento de citocinas protetoras (IL-10), porém, da mesma forma que em nosso trabalho, os autores não foram capazes de encontrar a presença das CTMs no tecido lesado, corroborando o efeito predominantemente parácrino exercido por estas células.<sup>117</sup>

Este efeito protetor, predominantemente parácrino, das CTMs também foi verificado por Remuzzi e colaboradores. Utilizando um modelo animal de LRA induzido por cisplatina, em que animais imunodeficientes evoluíam a óbito após 7 dias da administração da droga, eles verificaram que o grupo de animais que receberam as células derivadas da medula óssea humana, além de apresentar melhora funcional e histológica, mantinham a integridade do epitélio

tubular e da microvasculatura peri-tubular, prolongando a sobrevivência destes animais.<sup>118</sup>

Acreditava-se que pacientes que sobrevivessem à um insulto de LRA pudessem ter o completo retorno da função renal. Atualmente, entretanto, dados de modelos animais e de estudos clínicos, como coortes de pacientes adultos e pediátricos, tem mostrado que a longo prazo, a LRA pode levar ao desenvolvimento de DRC ou ao surgimento de alterações renais referentes a DRC como hiperfiltração, função renal reduzida, hipertensão e microalbuminúria.<sup>17-19,22,25</sup> Surpreendentemente, em nosso modelo de IR, observamos os efeitos a longo prazo do tratamento com CTAd, onde verificamos que a imunomodulação inicial ainda estava presente após 6 semanas com aumento de expressão de fatores protetores como HO-1 e BMP-7.

O BMP-7 é um competidor do receptor de TGF- $\beta$ , agindo como um potente inibidor da TEM e TEndM, neutralizando a ação do TGF- $\beta$  e diminuindo a progressão da DRC.<sup>119,120 121</sup> O TGF- $\beta$  é visto como a molécula mais importante como agente indutor de fibrose, através da ativação de fibroblastos residentes e por indução de TEM e TEndM.<sup>43,44,122</sup> Em nosso estudo, através do cálculo da razão da taxa de expressão de BMP-7 por TGF- $\beta$ , encontramos um efeito protetor da administração de CTAd, onde a expressão de BMP-7 suplanta a de TGF- $\beta$  nos animais tratados. Estes resultados correlacionam com a menor porcentagem de área fibrótica encontrada nos animais após o tratamento com CTAds, a qual é evidenciada principalmente pelo decréscimo da expressão de fatores pró-fibróticos (vimentina, CTGF e colágeno tipo I e IV), decréscimo do infiltrado de fibroblastos (células positivas para FSP-1) e com a diminuição na deposição de colágeno (colorações de picrosírius e Masson). Dessa forma, acreditamos que modulação inicial da

inflamação pode estar interferindo na via de sinalização do TGF- $\beta$ , o que resultaria em menos formação e ativação de miofibroblastos e diminuição da fibrose.

Adicionalmente, acreditamos que a melhora funcional pode também estar relacionado com o aumento da expressão de HO-1 nos tecidos renais de animais tratados com CTAds. Estudos envolvendo HO-1 mostraram que deficiência de sua expressão não apenas aumenta a suscetibilidade a LRA como também a progressão para o estado de DRC.<sup>123,124</sup> Após a lesão aguda, HO-1 é rapidamente induzida, porém sua expressão diminui rapidamente, antes da total recuperação do tecido renal. Esta rápida supressão da expressão de HO-1 permite uma contínua expressão de genes pró-inflamatórios e pró-fibróticos,<sup>123-125</sup> dentre eles os envolvidos na TEM, mediando assim a progressão do estado de LRA para a DRC.<sup>126</sup> Isto foi demonstrado no estudo de Kie *et al.* onde os autores evidenciaram em camundongos HO-1<sup>-/-</sup>, após obstrução aguda do trato urinário, um aumento do influxo de macrófagos, fibrose intersticial e aumento de marcadores de TEM como TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA e FSP-1. Quando os autores trataram as células tubulares proximais destes animais deficientes em HO-1 com TGF- $\beta$ , o resultado foi o mesmo, ocorreu um aumento da expressão de marcadores de TEM e fibrose intersticial,<sup>126</sup> mostrando a íntima relação entre expressão de HO-1 e progressão de LRA para DRC. Por outro lado, estudos utilizando superexpressão de HO-1 mostraram uma proteção do desenvolvimento da fibrose em modelos de LRA induzido por cisplatina,<sup>127,128</sup> IR,<sup>129</sup> lipopolissacarídeo,<sup>130</sup> obstrução do trato urinário<sup>131</sup> e após transplante renal.<sup>132</sup> Esta redução da lesão renal foi relacionada em graus variados de acordo com a atividade da HO-1 na degradação do heme (molécula nefrotóxica) e da ação de seus produtos finais desta degradação, como por exemplo os efeitos

vasodilatador, antioxidante e anti-inflamatório de seus subprodutos ( $\text{Fe}^{++}$ , CO e biliverdina).<sup>133</sup> Farenbach *et al.* mostraram que a transferência de macrófagos com superexpressão de HO-1 levava a proteção tecidual após LRA isquêmica, com redução da disfunção renal e diminuição da formação de microtrombos. Esta atividade protetora também foi relacionada a ação anti-inflamatória e aumento da fagocitose de células apoptóticas.<sup>134</sup>

Além da HO-1, há a isoforma HO-2 que também pode estar presente na mácula densa do rim. Rey *et al.* demonstraram que a atividade combinada destas duas isoformas inibe *feedback* túbulo-glomerular (FTG). Tal inibição previniu a vasoconstrição das arteríolas aferentes quando ocorreu o aumento da concentração de sal passando na mácula densa, preservando assim a taxa de filtração glomerular (TFG).<sup>135,136</sup> Este efeito supressor das HO-1 e -2 no FTG é decorrente das ações do CO e da biliverdina, subprodutos da HO sobre a degradação do heme, onde o primeiro suprime o FTG através da sinalização via guanilato ciclase, ao passo que o segundo o inibe ao “limpar” ânion superóxido, também responsável por aumentar o FTG. Este efeito supressor da HO no FTG pode ser relevante na LRA uma vez que a reabsorção de sódio estando prejudicada no túbulo proximal, há um aumento de sódio passando no néfron distal, gerando vasoconstrição da arteríola aferente e diminuição da TFG.<sup>135,136</sup> Neste cenário, a HO ao inibir o FTG inibiria a vasoconstrição da arteríola aferente, mantendo a TFG, o fluxo sanguíneo e a excreção normal de sódio.

Estudos já realizados com CTMs também mostraram o efeito renoprotetor da HO-1. Zarjou *et al.* através de um modelo de LRA induzida por cisplatina demonstraram que os efeitos renoprotetores das CTMs estão intimamente relacionados com a presença da HO-1. Foi evidenciado que somente o meio condicionado obtido de células HO-1+/+, mas não de células

HO-1-/-, reduziram o dano renal, sendo esse efeito correlacionado com uma maior produção de fatores pró-angiogênicos por estas células.<sup>99</sup> No nosso modelo de IR com 6 semanas, também foi possível verificar uma maior expressão de HO-1 e VEGF no grupo de animais que receberam CTAd. De forma adicional observamos que essa expressão estava correlacionada com a formação de menores áreas de hipóxia tecidual.

A hipóxia também é um indutor de TEM. Dentre as teorias de progressão de DRC, a hipóxia crônica pode levar a formação de fibrose através da rarefação de vasos. Aqui, observamos que o tratamento com as CTAd pode prevenir a TEM induzida por hipóxia. Usando uma *probe* específica, a qual detecta baixas áreas de pO<sub>2</sub>, uma *Hipoxiprobe*, encontramos reduzidas áreas de hipóxia nos animais tratados com CTAds quando comparados com os que não receberam tratamento. Esse efeito também pode ser resultado do aumento da expressão de ambos HO-1 e VEGF. Como descrito anteriormente, os subprodutos da degradação do heme pela HO-1 pode causar um aumento na microcirculação e vasodilatação dos tecidos renais. *Isner et al.* demonstraram *in vitro* que VEGF estimula a liberação de NO a partir do endotélio normal,<sup>137</sup> promovendo a recuperação do fluxo sanguíneo em membros isquemiados de coelho.<sup>138</sup>

Em nosso estudo, verificamos uma elevada expressão de iNOS, uma enzima conversora de NO, no tecidos renais de animais tratados com CTAd. Complementarmente, Papapetropoulos *et al.* e Ziche *et al.* demonstraram em modelos *in vitro* e *in vivo* que níveis fisiológicos de NO pode induzir a angiogênese.<sup>139-141</sup> Toyoaki *et al.* utilizando um modelo animal de isquemia em membro de coelho, também mostraram que por si só a ingestão oral de L-arginina, molécula que quando convertida em citrulina libera NO, conduziu a um aumento da angiogênese. De forma adicional foi verificado nesse estudo um

aumento de circulação colateral e um aumento da densidade capilar nos animais tratados com L-arginina em relação aos controles.<sup>142</sup> Embora em determinadas condições, a expressão de iNOS está relacionada com inflamação, a produção em níveis fisiológicos de NO por iNOS pode também estar associada com uma maior vasodilatação que por sua vez pode levar a diminuição das áreas de hipóxia, enquanto que sua ação angiogênica está relacionada tanto com sua capacidade de liberar NO quanto de modular positivamente a expressão de VEGF.<sup>143,144</sup> VEGF é um fator chave para o crescimento de vasos, o qual pode influenciar no desenvolvimento normal glomerular vascular. A alta expressão destas moléculas nos animais tratados com CTAds suporta a ação pró-angiogênicas das células-tronco com conseqüente aumento na vascularização e redução da hipóxia crônica.

Embora nenhum modelo experimental ideal de DRC exista, acreditamos que o modelo de isquemia renal grave aqui utilizado, permite estudar as conseqüências de uma inflamação persistente, e posteriormente avaliar os resultados do tratamento com CTAds em um ponto específico. Para isso, nós administramos as CTAds na sexta semana após reperusão, uma vez que neste ponto nossos resultados prévios juntamente com dados da literatura já demonstrava a presença de um quadro de fibrose intersticial.<sup>113,145</sup> Após 4 semanas da administração das CTAds, totalizando 10 semanas após reperusão, coletamos os dados para análise. Os resultados foram surpreendentes. Encontramos nos animais tratados com CTAds uma alta expressão de fatores renoprotetores (IL-10 e BMP-7) e baixa expressão de fatores pró-fibróticos. Por meio de análises histológicas e protéicas verificamos também no grupo tratado uma diminuição de fibrose intersticial pré-estabelecida.

Diversos estudos já apresentaram a possibilidade de regressão da fibrose. Inibidores de angiotensina tem um importante papel na progressão e potencial regressão da glomeruloesclerose.<sup>146,147</sup> O tratamento com VEGF-a também resulta em diminuição de dano e aumento da proliferação de células endoteliais e aumento do reparo capilar em modelos de glomerulonefrite aguda ou microangiopatia trombótica <sup>148</sup>. O tratamento com BMP-7 pode reverter fibrose renal induzida por TGF em camundongos<sup>149</sup> . De uma forma inovadora, nosso trabalho apresenta a possibilidade de regressão de fibrose através do tratamento com CTAds. Acreditamos que o decréscimo da fibrose é resultado de uma série de fatores decorrentes das propriedades reguladoras e citoprotetoras das células-tronco.

Considerando que indutores de TEM são ativados em um microambiente inflamatório, em que tanto TGF- $\beta$  como hipóxia podem induzir a expressão de específicos fatores de transcrição. A modulação da inflamação juntamente com o aumento de expressão de fatores renoprotetores, anti-fibróticos e angiogênicos levariam a um bloqueio da TEM, em que células mesenquimais retornariam ao seu fenótipo epitelial e/ou endotelial através de um evento bidirecional contínuo.

Em resumo, propomos aqui que o tratamento com CTAd pode cessar a progressão de formação de fibrose ou até reverter um processo fibrótico pré-estabelecido. Acreditamos que o mecanismo envolvido pode estar relacionado com a ação imunomodulatória e citoprotetora das CTAds, o que levaria a uma diminuição da TEM e conseqüente melhora funcional renal. Dessa forma, esperamos que os resultados obtidos nesse trabalho possam contribuir para a identificação de potenciais vias de lesão ou de regeneração renal, facilitando a sua tradução mais simples e rápida para a prática clínica.

## 7. CONCLUSÕES:

Especificamente, podemos concluir que:

- i. As CTAd são efetivas em prevenir os danos renais crônicos secundário a uma isquemia severa, ao reduzir o processo pró-inflamatório, reduzir a hipóxia tecidual e favorecer a angiogênese;
- ii. As CTAd foram capazes de reverter um quadro de fibrose já instalado, provavelmente por interferir na resposta inflamatória persistente que incitaria as modificações fenotípicas e funcionais em células epiteliais e endoteliais; e
- iii. As CTAds também foram efetivas em reduzir o processo fibrótico e inflamatório noutro modelo de DRC, a NTI experimental induzida por ingesta de adenina.

Em resumo, este trabalho demonstra que CTAds podem vir a ser uma forma terapêutica alternativa no tratamento e na prevenção de DRC.

O maior entendimento das propriedades imunomoduladoras, angiogênicas, antiapoptóticas e antifibróticas destas células trariam benefícios na clínica médica não só em doenças renais, mas em diversas patologias onde a terapêutica atual ainda não é efetiva.

---

**8. REFERÊNCIAS**

1. Wang HE, Muntner P, Chertow GM, Warnock DG. Acute kidney injury and mortality in hospitalized patients. *Am J Nephrol*. 2012;35(4):349-355.
2. Heung M, Chawla LS. Predicting progression to chronic kidney disease after recovery from acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Nov 2012;21(6):628-634.
3. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet*. Aug 25 2012;380(9843):756-766.
4. Dirkes S. Acute kidney injury: not just acute renal failure anymore? *Crit Care Nurse*. Feb 2011;31(1):37-49; quiz 50.
5. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med*. May 30 1996;334(22):1448-1460.
6. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. May 1993;43(5):1160-1178.
7. Burne-Taney MJ, Yokota N, Rabb H. Persistent renal and extrarenal immune changes after severe ischemic injury. *Kidney Int*. Mar 2005;67(3):1002-1009.
8. Abbate M, Bonventre JV, Brown D. The microtubule network of renal epithelial cells is disrupted by ischemia and reperfusion. *Am J Physiol*. Dec 1994;267(6 Pt 2):F971-978.
9. Fish EM, Molitoris BA. Alterations in epithelial polarity and the pathogenesis of disease states. *N Engl J Med*. Jun 2 1994;330(22):1580-1588.
10. Zuk A, Bonventre JV, Brown D, Matlin KS. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol*. Sep 1998;275(3 Pt 1):C711-731.
11. Zuk A, Bonventre JV, Matlin KS. Expression of fibronectin splice variants in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jun 2001;280(6):F1037-1053.
12. Grino JM. BN 52021: a platelet activating factor antagonist for preventing post-transplant renal failure. A double-blind, randomized study. The BN 52021 Study Group in Renal Transplantation. *Ann Intern Med*. Sep 1 1994;121(5):345-347.
13. Klausner JM, Paterson IS, Goldman G, et al. Postischemic renal injury is mediated by neutrophils and leukotrienes. *Am J Physiol*. May 1989;256(5 Pt 2):F794-802.
14. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. Jan 28 1994;76(2):301-314.
15. Liano F, Felipe C, Tenorio MT, et al. Long-term outcome of acute tubular necrosis: a contribution to its natural history. *Kidney Int*. Apr 2007;71(7):679-686.
16. Lowe KG. The late prognosis in acute tubular necrosis; an interim follow-up report on 14 patients. *Lancet*. May 31 1952;1(6718):1086-1088.
17. Chawla LS, Amdur RL, Amodeo S, Kimmel PL, Palant CE. The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. *Kidney Int*. Jun 2011;79(12):1361-1369.
18. Lo LJ, Go AS, Chertow GM, et al. Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease. *Kidney Int*. Oct 2009;76(8):893-899.
19. Amdur RL, Chawla LS, Amodeo S, Kimmel PL, Palant CE. Outcomes following diagnosis of acute renal failure in U.S. veterans: focus on acute tubular necrosis. *Kidney Int*. Nov 2009;76(10):1089-1097.

20. Wald R, Quinn RR, Luo J, et al. Chronic dialysis and death among survivors of acute kidney injury requiring dialysis. *JAMA*. Sep 16 2009;302(11):1179-1185.
21. Thakar CV, Christianson A, Himmelfarb J, Leonard AC. Acute kidney injury episodes and chronic kidney disease risk in diabetes mellitus. *Clin J Am Soc Nephrol*. Nov 2011;6(11):2567-2572.
22. Goldstein SL, Devarajan P. Acute kidney injury in childhood: should we be worried about progression to CKD? *Pediatr Nephrol*. Apr 2011;26(4):509-522.
23. Goldstein SL, Devarajan P. Progression from acute kidney injury to chronic kidney disease: a pediatric perspective. *Adv Chronic Kidney Dis*. Jul 2008;15(3):278-283.
24. Hui-Stickle S, Brewer ED, Goldstein SL. Pediatric ARF epidemiology at a tertiary care center from 1999 to 2001. *Am J Kidney Dis*. Jan 2005;45(1):96-101.
25. Askenazi DJ, Feig DI, Graham NM, Hui-Stickle S, Goldstein SL. 3-5 year longitudinal follow-up of pediatric patients after acute renal failure. *Kidney Int*. Jan 2006;69(1):184-189.
26. Ingelfinger JR. Disparities in renal endowment: causes and consequences. *Adv Chronic Kidney Dis*. Apr 2008;15(2):107-114.
27. Hostetter TH. Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:263-278.
28. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *J Am Soc Nephrol*. Jun 2001;12(6):1315-1325.
29. Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int*. Sep 2012;82(5):516-524.
30. Venkatachalam MA, Griffin KA, Lan R, Geng H, Saikumar P, Bidani AK. Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. May 2010;298(5):F1078-1094.
31. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. Nov 2011;121(11):4210-4221.
32. Jaber BL, Rao M, Guo D, et al. Cytokine gene promoter polymorphisms and mortality in acute renal failure. *Cytokine*. Mar 7 2004;25(5):212-219.
33. Bougle A, Duranteau J. Pathophysiology of sepsis-induced acute kidney injury: the role of global renal blood flow and renal vascular resistance. *Contrib Nephrol*. 2011;174:89-97.
34. Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med (Berl)*. Sep 2009;87(9):859-864.
35. van Kooten C, Woltman AM, Daha MR. Immunological function of tubular epithelial cells: the functional implications of CD40 expression. *Exp Nephrol*. Jul-Oct 2000;8(4-5):203-207.
36. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. Jun 2009;119(6):1420-1428.
37. Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med*. Dec 2010;16(12):1400-1406.
38. Gentle ME, Shi S, Daehn I, et al. Epithelial cell TGFbeta signaling induces acute tubular injury and interstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol*. Apr 2013;24(5):787-799.
39. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. Dec 2011;7(12):684-696.

40. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol*. Feb 2002;118(2):211-215.
41. Li J, Qu X, Bertram JF. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol*. Oct 2009;175(4):1380-1388.
42. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol*. Nov 2010;225(3):631-637.
43. Barnes JL, Glass WF, 2nd. Renal interstitial fibrosis: a critical evaluation of the origin of myofibroblasts. *Contrib Nephrol*. 2011;169:73-93.
44. Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol*. Sep 2011;179(3):1074-1080.
45. Medici D, Kalluri R. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Semin Cancer Biol*. Oct 2012;22(5-6):379-384.
46. Strutz F, Neilson EG. New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol*. May 2003;24(4):459-476.
47. Liu X. Inflammatory cytokines augments TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating TbetaR-I. *Cell Motil Cytoskeleton*. Dec 2008;65(12):935-944.
48. Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, de Herreros AG, Mercurio AM. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*. Jan 3 2005;168(1):29-33.
49. Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*. May 5 2009;15(5):416-428.
50. Lopez-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med*. Sep 2009;1(6-7):303-314.
51. Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med*. May 2010;16(5):535-543, 531p following 143.
52. Wynn TA. Fibrosis under arrest. *Nat Med*. May 2010;16(5):523-525.
53. Bechtel W, McGoochan S, Zeisberg EM, et al. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med*. May 2010;16(5):544-550.
54. Megyesi J, Udvarhelyi N, Safirstein RL, Price PM. The p53-independent activation of transcription of p21 WAF1/CIP1/SDI1 after acute renal failure. *Am J Physiol*. Dec 1996;271(6 Pt 2):F1211-1216.
55. Basile DP, Friedrich JL, Spahic J, et al. Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. Mar 2011;300(3):F721-733.
56. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol*. Nov 2001;281(5):F887-899.
57. Yuan HT, Li XZ, Pitera JE, Long DA, Woolf AS. Peritubular capillary loss after mouse acute nephrotoxicity correlates with down-regulation of vascular endothelial growth factor-A and hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Am J Pathol*. Dec 2003;163(6):2289-2301.

58. O'Riordan E, Mendeleev N, Patschan S, et al. Chronic NOS inhibition actuates endothelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jan 2007;292(1):H285-294.
59. Horbelt M, Lee SY, Mang HE, et al. Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. Sep 2007;293(3):F688-695.
60. John R, Herzenberg AM. Renal toxicity of therapeutic drugs. *J Clin Pathol*. Jun 2009;62(6):505-515.
61. Engle SJ, Stockelman MG, Chen J, et al. Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 28 1996;93(11):5307-5312.
62. Bouzidi H, Lacour B, Daudon M. [2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis: from diagnosis to therapy]. *Ann Biol Clin (Paris)*. Nov-Dec 2007;65(6):585-592.
63. Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, Koizumi F. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron*. 1986;44(3):230-234.
64. Nasr SH, Sethi S, Cornell LD, et al. Crystalline nephropathy due to 2,8-dihydroxyadeninuria: an under-recognized cause of irreversible renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. Jun 2010;25(6):1909-1915.
65. Semedo P, Correa-Costa M, Antonio Cenedeze M, et al. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells*. Dec 2009;27(12):3063-3073.
66. Morigi M, Imberti B, Zoja C, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. Jul 2004;15(7):1794-1804.
67. Chen YT, Sun CK, Lin YC, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. *J Transl Med*. 2011;9:51.
68. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
69. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. Apr 2 1999;284(5411):143-147.
70. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. Aug 2002;30(8):896-904.
71. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int*. Feb 2003;72(2):135-142.
72. Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N, et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. Dec 2004;89(12):1421-1427.
73. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. Sep 27 2005;80(6):836-842.
74. De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, et al. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum*. Apr 2006;54(4):1209-1221.
75. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. Apr 2001;7(2):211-228.

76. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* Oct-Dec 2009;20(5-6):419-427.
77. Bassi EJ, de Almeida DC, Moraes-Vieira PM, Camara NO. Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* Jun 2012;8(2):329-342.
78. Rabb H, Ramirez G, Saba SR, et al. Renal ischemic-reperfusion injury in L-selectin-deficient mice. *Am J Physiol.* Aug 1996;271(2 Pt 2):F408-413.
79. Rabb H, Daniels F, O'Donnell M, et al. Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* Sep 2000;279(3):F525-531.
80. Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* Jul 2005;289(1):F31-42.
81. Semedo P, Palasio CG, Oliveira CD, et al. Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury. *Int Immunopharmacol.* Jun 2009;9(6):677-682.
82. Eliopoulos N, Zhao J, Bouchentouf M, et al. Human marrow-derived mesenchymal stromal cells decrease cisplatin renotoxicity in vitro and in vivo and enhance survival of mice post-intraperitoneal injection. *Am J Physiol Renal Physiol.* Dec 2010;299(6):F1288-1298.
83. Feng Z, Ting J, Alfonso Z, et al. Fresh and cryopreserved, uncultured adipose tissue-derived stem and regenerative cells ameliorate ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* Dec 2010;25(12):3874-3884.
84. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Mol Med.* Sep-Oct 2007;11(5):1012-1030.
85. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells.* Oct 2007;25(10):2648-2659.
86. Sanz L, Santos-Valle P, Alonso-Camino V, et al. Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvasc Res.* Apr 2008;75(3):308-314.
87. Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood.* May 1 2008;111(9):4551-4558.
88. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest.* Sep 2004;114(6):795-804.
89. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol.* Dec 2003;14(12):3138-3146.
90. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol.* Sep 2006;17(9):2443-2456.
91. Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, et al. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *J Am Soc Nephrol.* Nov 2007;18(11):2921-2928.

92. Hauser PV, De Fazio R, Bruno S, et al. Stem cells derived from human amniotic fluid contribute to acute kidney injury recovery. *Am J Pathol.* Oct 2010;177(4):2011-2021.
93. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol.* May 2009;20(5):1053-1067.
94. Lu S, Lu C, Han Q, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells protect PC12 cells from glutamate excitotoxicity-induced apoptosis by upregulation of XIAP through PI3-K/Akt activation. *Toxicology.* Jan 11 2011;279(1-3):189-195.
95. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney Int.* Mar 2002;61(3):855-861.
96. Kim MH, Cho GW, Huh YM, Kim SH. Transduction of human EPO into human bone marrow mesenchymal stromal cells synergistically enhances cell-protective and migratory effects. *Mol Biol (Mosk).* Jul-Aug 2010;44(4):656-663.
97. Vanella L, Sanford C, Jr., Kim DH, Abraham NG, Ebraheim N. Oxidative stress and heme oxygenase-1 regulated human mesenchymal stem cells differentiation. *Int J Hypertens.* 2012;2012:890671.
98. Camara NO, Soares MP. Heme oxygenase-1 (HO-1), a protective gene that prevents chronic graft dysfunction. *Free Radic Biol Med.* Feb 15 2005;38(4):426-435.
99. Zarjou A, Kim J, Traylor AM, et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cells in cisplatin-induced renal injury require heme oxygenase-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* Jan 2011;300(1):F254-262.
100. Cavaglieri RC, Martini D, Sogayar MC, Noronha IL. Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model. *Transplant Proc.* Apr 2009;41(3):947-951.
101. Alexandre CS, Volpini RA, Shimizu MH, et al. Lineage-negative bone marrow cells protect against chronic renal failure. *Stem Cells.* Mar 2009;27(3):682-692.
102. Leung VY, Aladin DM, Lv F, et al. Mesenchymal stem cells reduce intervertebral disc fibrosis and facilitate repair. *Stem Cells.* Apr 15 2014.
103. Katsuno T, Ozaki T, Saka Y, et al. Low serum cultured adipose tissue-derived stromal cells ameliorate acute kidney injury in rats. *Cell Transplant.* 2013;22(2):287-297.
104. Asanuma H, Vanderbrink BA, Campbell MT, et al. Arterially delivered mesenchymal stem cells prevent obstruction-induced renal fibrosis. *J Surg Res.* Jun 1 2011;168(1):e51-59.
105. Mias C, Lairez O, Trouche E, et al. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells.* Nov 2009;27(11):2734-2743.
106. Shu T, Zeng B, Ren X, Li Y. HO-1 modified mesenchymal stem cells modulate MMPs/TIMPs system and adverse remodeling in infarcted myocardium. *Tissue Cell.* Aug 2010;42(4):217-222.
107. Albesiano E, Messmer BT, Damle RN, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. *Blood.* Nov 1 2003;102(9):3333-3339.
108. Dekel B, Shezen E, Even-Tov-Friedman S, et al. Transplantation of human hematopoietic stem cells into ischemic and growing kidneys suggests a role in vasculogenesis but not tubulogenesis. *Stem Cells.* May 2006;24(5):1185-1193.

109. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* Jan 2008;214(2):199-210.
110. Bi B, Schmitt R, Israilova M, Nishio H, Cantley LG. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. *J Am Soc Nephrol.* Sep 2007;18(9):2486-2496.
111. Li B, Cohen A, Hudson TE, Motlagh D, Amrani DL, Duffield JS. Mobilized human hematopoietic stem/progenitor cells promote kidney repair after ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* May 25 2010;121(20):2211-2220.
112. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA.* Nov 7 2007;298(17):2038-2047.
113. Semedo P, Donizetti-Oliveira C, Burgos-Silva M, et al. Bone marrow mononuclear cells attenuate fibrosis development after severe acute kidney injury. *Lab Invest.* May 2010;90(5):685-695.
114. Correa-Costa M, Braga TT, Semedo P, et al. Pivotal role of Toll-like receptors 2 and 4, its adaptor molecule MyD88, and inflammasome complex in experimental tubule-interstitial nephritis. *PLoS One.* 2011;6(12):e29004.
115. Mu W, Ouyang X, Agarwal A, et al. IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* Dec 2005;16(12):3651-3660.
116. Menard C, Tarte K. [Immunosuppression and mesenchymal stem cells: back to the future]. *Med Sci (Paris).* Mar 2011;27(3):269-274.
117. Reis LA, Borges FT, Simoes MJ, Borges AA, Sinigaglia-Coimbra R, Schor N. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repaired but did not prevent gentamicin-induced acute kidney injury through paracrine effects in rats. *PLoS One.* 2012;7(9):e44092.
118. Morigi M, Inrona M, Imberti B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells.* Aug 2008;26(8):2075-2082.
119. Wang S, Hirschberg R. BMP7 antagonizes TGF-beta -dependent fibrogenesis in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* May 2003;284(5):F1006-1013.
120. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med.* Jul 2003;9(7):964-968.
121. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* Dec 2004;22(4):233-241.
122. Lee J, Choi JH, Joo CK. TGF-beta1 regulates cell fate during epithelial-mesenchymal transition by upregulating survivin. *Cell Death Dis.* 2013;4:e714.
123. Nath KA, Croatt AJ, Haggard JJ, Grande JP. Renal response to repetitive exposure to heme proteins: chronic injury induced by an acute insult. *Kidney Int.* Jun 2000;57(6):2423-2433.
124. Nath KA, Vercellotti GM, Grande JP, et al. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int.* Jan 2001;59(1):106-117.
125. Zager RA, Johnson AC. Progressive histone alterations and proinflammatory gene activation: consequences of heme protein/iron-mediated proximal tubule injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* Mar 2010;298(3):F827-837.
126. Kie JH, Kapturczak MH, Traylor A, Agarwal A, Hill-Kapturczak N. Heme oxygenase-1 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* Sep 2008;19(9):1681-1691.

127. Agarwal A, Balla J, Alam J, Croatt AJ, Nath KA. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney Int.* Oct 1995;48(4):1298-1307.
128. Shiraishi F, Curtis LM, Truong L, et al. Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* May 2000;278(5):F726-736.
129. Tracz MJ, Juncos JP, Croatt AJ, et al. Deficiency of heme oxygenase-1 impairs renal hemodynamics and exaggerates systemic inflammatory responses to renal ischemia. *Kidney Int.* Nov 2007;72(9):1073-1080.
130. Tracz MJ, Juncos JP, Grande JP, et al. Renal hemodynamic, inflammatory, and apoptotic responses to lipopolysaccharide in HO-1<sup>-/-</sup> mice. *Am J Pathol.* Jun 2007;170(6):1820-1830.
131. Kim JH, Yang JI, Jung MH, et al. Heme oxygenase-1 protects rat kidney from ureteral obstruction via an antiapoptotic pathway. *J Am Soc Nephrol.* May 2006;17(5):1373-1381.
132. Blydt-Hansen TD, Katori M, Lassman C, et al. Gene transfer-induced local heme oxygenase-1 overexpression protects rat kidney transplants from ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* Mar 2003;14(3):745-754.
133. Nath KA. The role of renal research in demonstrating the protective properties of heme oxygenase-1. *Kidney Int.* Jul 2013;84(1):3-6.
134. Ferenbach DA, Ramdas V, Spencer N, et al. Macrophages expressing heme oxygenase-1 improve renal function in ischemia/reperfusion injury. *Mol Ther.* Sep 2010;18(9):1706-1713.
135. Ren Y, D'Ambrosio MA, Wang H, Liu R, Garvin JL, Carretero OA. Heme oxygenase metabolites inhibit tubuloglomerular feedback (TGF). *Am J Physiol Renal Physiol.* Oct 2008;295(4):F1207-1212.
136. Wang H, Garvin JL, D'Ambrosio MA, et al. Heme oxygenase metabolites inhibit tubuloglomerular feedback in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Apr 2011;300(4):H1320-1326.
137. van der Zee R, Murohara T, Luo Z, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation.* Feb 18 1997;95(4):1030-1037.
138. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, et al. Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. *Circulation.* Jun 1 1995;91(11):2802-2809.
139. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest.* Dec 15 1997;100(12):3131-3139.
140. Papapetropoulos A, Desai KM, Rudic RD, et al. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro. *Am J Pathol.* May 1997;150(5):1835-1844.
141. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest.* Nov 1994;94(5):2036-2044.
142. Murohara T, Asahara T, Silver M, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest.* Jun 1 1998;101(11):2567-2578.

143. Chin K, Kurashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S, Esumi H. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*. Jul 24 1997;15(4):437-442.
144. Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol*. Aug 2005;15(4):277-289.
145. Feitoza CQ, Goncalves GM, Semedo P, et al. Inhibition of COX 1 and 2 prior to renal ischemia/reperfusion injury decreases the development of fibrosis. *Mol Med*. Nov-Dec 2008;14(11-12):724-730.
146. Dussaule JC, Chatziantoniou C. [Reversal of renal fibrosis: lessons from experimental models]. *Bull Acad Natl Med*. May 2008;192(5):987-1000; discussion 1000-1001.
147. Hill GS, Delahousse M, Nochy D, et al. Outcome of relapse in lupus nephritis: roles of reversal of renal fibrosis and response of inflammation to therapy. *Kidney Int*. Jun 2002;61(6):2176-2186.
148. Satchell SC, Mathieson PW. Angiopoietins: microvascular modulators with potential roles in glomerular pathophysiology. *J Nephrol*. Mar-Apr 2003;16(2):168-178.
149. Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, et al. Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol*. Dec 2003;285(6):F1060-1067.

## 9. ANEXOS:

### 9.1 Produção Científica:

- *Adipose Tissue-Derived Stem Cell Treatment Prevents Renal Disease Progression.*  
DONIZETTI-OLIVEIRA, C ; Semedo, Patricia ; Burgos-Silva, Marina ; Cenedeze, Marco Antonio ; Malheiros, Denise M A C ; Reis, Marlene A. ; Pacheco-Silva, Alvaro ; Câmara, Niels Olsen Saraiva .  
Cell Transplantation, 2012.
- *MyD88 Signaling Pathway is Involved in Renal Fibrosis by favoring a TH2 Immune Response and Activating Alternative M2 Macrophages.*  
Braga, Tarcio Teodoro ; Correa-Costa, Matheus ; OLIVEIRA, CASSIANO D ; Cenedeze, M. A. ;; Camara, NOS.
- *Invariant Natural Killer T Cell Agonist Modulates Experimental Focal and Segmental Glomerulosclerosis.*  
Pereira, Rafael L. ; Reis, Vanessa O. ; DONIZETTI-OLIVEIRA, CASSIANO ; Cenedeze, Marcos A. ; Pacheco-Silva, Alvaro ; Savage, Paul B. ; Câmara, Niels O. S. ; Keller, Alexandre C. .
- *In Search of Mechanisms Associated with Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies for Acute Kidney Injury*  
Almeida,D; DONIZETTI-OLIVEIRA,C; Barbosa-Costa, P; Câmara,NOS

## Adipose Tissue-Derived Stem Cell Treatment Prevents Renal Disease Progression

Cassiano Donizetti-Oliveira,\* Patricia Semedo,\* Marina Burgos-Silva,\* Marco Antonio Cenedeze,\* Denise Maria Avancini Costa Malheiros,† Marlene A. Reis,‡ Alvaro Pacheco-Silva,\* and Niels Olsen Saraiva Câmara\*§

\*Experimental and Clinical Immunology Laboratory, Division of Nephrology, Federal University of São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil

†Pathology Department, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

‡Pathology Division, UFTM, Uberaba, Minas Gerais, Brazil

§Laboratory of Transplantation Immunobiology, Department of Immunology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Adipose tissue-derived stem cells (ASCs) are an attractive source of stem cells with regenerative properties that are similar to those of bone marrow stem cells. Here, we analyze the role of ASCs in reducing the progression of kidney fibrosis. Progressive renal fibrosis was achieved by unilateral clamping of the renal pedicle in mice for 1 h; after that, the kidney was reperfused immediately. Four hours after the surgery,  $2 \times 10^5$  ASCs were intraperitoneally administered, and mice were followed for 24 h posttreatment and then at some other time interval for the next 6 weeks. Also, animals were treated with  $2 \times 10^5$  ASCs at 6 weeks after reperfusion and sacrificed 4 weeks later to study their effect when interstitial fibrosis is already present. At 24 h after reperfusion, ASC-treated animals showed reduced renal dysfunction and enhanced regenerative tubular processes. Renal mRNA expression of IL-6 and TNF was decreased in ASC-treated animals, whereas IL-4, IL-10, and HO-1 expression increased despite a lack of ASCs in the kidneys as determined by SRY analysis. As expected, untreated kidneys shrank at 6 weeks, whereas the kidneys of ASC-treated animals remained normal in size, showed less collagen deposition, and decreased staining for FSP-1, type I collagen, and Hypoxyprobe. The renal protection seen in ASC-treated animals was followed by reduced serum levels of TNF- $\alpha$ , KC, RANTES, and IL-1 $\alpha$ . Surprisingly, treatment with ASCs at 6 weeks, when animals already showed installed fibrosis, demonstrated amelioration of functional parameters, with less tissue fibrosis observed and reduced mRNA expression of type I collagen and vimentin. ASC therapy can improve functional parameters and reduce progression of renal fibrosis at early and later times after injury, mostly due to early modulation of the inflammatory response and to less hypoxia, thereby reducing the epithelial–mesenchymal transition.

Key words: Adipose-derived stem cell; Acute kidney injury; Ischemia-reperfusion injury; Fibrosis; Inflammation

### INTRODUCTION

Despite all efforts to manage acute kidney injury (AKI) patients, this syndrome is still associated with high mortality and morbidity rates. Moreover, it has a high incidence and may affect approximately 7% of all hospitalized patients, with the mortality rate reaching near 50% of AKI patients in intensive care units (ICUs) (34,40). Among long-term AKI surviving patients (1–10 years), approximately 12.5% are dialysis dependent and 19–31% develop chronic kidney disease (CKD) (15). This scenario can be caused by incomplete repair of epithelial cells after AKI

and persistent tubule-interstitial inflammation, leading to an increase in fibroblast proliferation and the activation of myofibroblasts and resulting in excessive deposition of extracellular matrix proteins in kidney (15,31). The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) has been suggested as one the main pathways in fibrosis development in the progression of AKI to CKD (24,41).

The EMT can be viewed as an adaptive response of epithelial cells after chronic stress/injury. Hypoxia, oxidative stress, and inflammation can produce and release several chemokines and cytokines that attract and direct

Received October 27, 2010; final acceptance September 20, 2011. Online prepub date: February 2, 2012.

Address correspondence to Niels Olsen Saraiva Câmara, M.D., Nephrology Division, Federal University of São Paulo, 740 Botucatu St., 04023-900, Vila Clementino, São Paulo, Brazil. Tel: (5511)-59041699; Fax: (5511)-59041894; E-mail: niels@nefro.epm.br

## MyD88 Signaling Pathway Is Involved in Renal Fibrosis by Favoring a T<sub>H</sub>2 Immune Response and Activating Alternative M2 Macrophages

Tarcio Teodoro Braga,<sup>1</sup> Matheus Correa-Costa,<sup>1</sup> Yuri Felipe Souza Guise,<sup>1</sup> Angela Castoldi,<sup>2</sup> Cassiano Donizetti de Oliveira,<sup>2</sup> Meire Ioshie Hyane,<sup>1</sup> Marcos Antonio Cenedeze,<sup>2</sup> Simone Aparecida Teixeira,<sup>3</sup> Marcelo Nicolas Muscara,<sup>3</sup> Katia Regina Perez,<sup>4</sup> Iolanda Midea Cuccovia,<sup>4</sup> Alvaro Pacheco-Silva,<sup>2</sup> Giselle Martins Gonçalves,<sup>1</sup> and Niels Olsen Saraiva Camara<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Transplantation Immunobiology, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences IV, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Nephrology Division, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil; <sup>3</sup>Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences; and <sup>4</sup>Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

Inflammation contributes to the pathogenesis of chronic kidney disease (CKD). Molecules released by the inflamed injured tissue can activate toll-like receptors (TLRs), thereby modulating macrophage and CD4<sup>+</sup> T-cell activity. We propose that in renal fibrogenesis, M2 macrophages are recruited and activated in a T helper subset 2 cell (T<sub>H</sub>2)-prone inflammatory milieu in a MyD88-dependent manner. Mice submitted to unilateral ureteral ligation (UUO) demonstrated an increase in macrophage infiltration with collagen deposition after 7 d. Conversely, TLR2, TLR4 and MyD88 knockout (KO) mice had an improved renal function together with diminished T<sub>H</sub>2 cytokine production and decreased fibrosis formation. Moreover, TLR2, TLR4 and MyD88 KO animals exhibited less M2 macrophage infiltration, namely interleukin (IL)-10<sup>+</sup> and CD206<sup>+</sup> CD11b<sup>high</sup> cells, at 7 d after surgery. We evaluated the role of a T<sub>H</sub>2 cytokine in this context, and observed that the absence of IL-4 was associated with better renal function, decreased IL-13 and TGF- $\beta$  levels, reduced arginase activity and a decrease in fibrosis formation when compared with IL-12 KO and wild-type (WT) animals. Indeed, the better renal outcomes and the decreased fibrosis formation were restricted to the deficiency of IL-4 in the hematopoietic compartment. Finally, macrophage depletion, rather than the absence of T cells, led to reduced lesions of the glomerular filtration barrier and decreased collagen deposition. These results provide evidence that future therapeutic strategies against renal fibrosis should be accompanied by the modulation of the M1:M2 and T<sub>H</sub>1:T<sub>H</sub>2 balance, as T<sub>H</sub>2 and M2 cells are predictive of fibrosis toward mechanisms that are sensed by innate immune response and triggered in a MyD88-dependent pathway.

Online address: <http://www.molmed.org>  
doi: 10.2119/molmed.2012.00131

### INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is a major health problem, highly prevalent in the general population, and associated with a high mortality rate mainly due to cardiovascular complications (1). Several animal models have been used to study

different features of CKD (2), and the use of genetically engineered mice has greatly expanded the utility of this model in studying molecular mechanisms underlying the renal response to chronic insults (3). Specifically, unilateral ureteral ligation (UUO) induces, after a

few hours, cellular infiltration into the kidney, mainly macrophages that secrete growth factors and cytokines that ultimately induce disequilibrium between apoptosis and proliferation of the tubular cells, which favors fibroblast activation and proliferation. Activated fibroblasts secrete additional extracellular matrix (ECM) components that accumulate in the interstitium, and, as the obstruction continues, ECM deposition becomes massive, and the uncontrolled apoptosis of cells results in tubular atrophy (3). This matrix remodeling and cellular stress can release molecules that finally instigate an inflammatory response.

Toll-like receptors (TLRs) are an innate family of receptors that can sense tissue

**Address correspondence to** Niels Olsen Saraiva Câmara, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Cidade Universitária, Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900, São Paulo, Brazil. Phone: +55-11-3091-7388; Fax: +55-11-3091-7224; E-mail: [niels@icb.usp.br](mailto:niels@icb.usp.br).

Submitted March 21, 2012; Accepted for publication July 5, 2012; Epub (www.molmed.org) ahead of print July 5, 2012.

The Feinstein Institute  
for Medical Research 

# Invariant Natural Killer T Cell Agonist Modulates Experimental Focal and Segmental Glomerulosclerosis

Rafael L. Pereira<sup>1,9</sup>, Vanessa O. Reis<sup>1,9</sup>, Patricia Semedo<sup>1</sup>, Bruna N. Buscariollo<sup>1</sup>, Cassiano Donizetti-Oliveira<sup>1</sup>, Marcos A. Cenedeze<sup>1</sup>, Maria Fernanda Soares<sup>1</sup>, Alvaro Pacheco-Silva<sup>1,2</sup>, Paul B. Savage<sup>3</sup>, Niels O. S. Câmara<sup>1,4</sup>, Alexandre C. Keller<sup>1,5\*</sup>

**1** Departamento de Medicina – Nefrologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil, **2** Unidade de Transplante Renal, Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, São Paulo, Brasil, **3** Department of Chemistry and Biochemistry Brigham Young University, Provo, Utah, United States of America, **4** Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, **5** Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

## Abstract

A growing body of evidence demonstrates a correlation between Th2 cytokines and the development of focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS). Therefore, we hypothesized that GSL-1, a monoglycosylceramide from *Sphingomonas* sp. with pro-Th1 activity on invariant Natural Killer T (iNKT) lymphocytes, could counterbalance the Th2 profile and modulate glomerulosclerosis. Using an adriamycin(ADM)-based model of FSGS, we found that BALB/c mice presented albuminuria and glomerular degeneration in association with a Th2-like pro-fibrogenic profile; these mice also expressed a combination of inflammatory cytokines, such as IL-4, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$ , and chemokines, such as RANTES and eotaxin. In addition, we observed a decrease in the mRNA levels of GD3 synthase, the enzyme responsible for GD3 metabolism, a glycolipid associated with podocyte physiology. GSL-1 treatment inhibited ADM-induced renal dysfunction and preserved kidney architecture, a phenomenon associated with the induction of a Th1-like response, increased levels of GD3 synthase transcripts and inhibition of pro-fibrotic transcripts and inflammatory cytokines. TGF- $\beta$  analysis revealed increased levels of circulating protein and tissue transcripts in both ADM- and GSL-1-treated mice, suggesting that TGF- $\beta$  could be associated with both FSGS pathology and iNKT-mediated immunosuppression; therefore, we analyzed the kidney expression of phosphorylated SMAD2/3 and SMAD7 proteins, molecules associated with the deleterious and protective effects of TGF- $\beta$ , respectively. We found high levels of phosphoSMAD2/3 in ADM mice in contrast to the GSL-1 treated group in which SMAD7 expression increased. These data suggest that GSL-1 treatment modulates the downstream signaling of TGF- $\beta$  through a renoprotective pathway. Finally, GSL-1 treatment at day 4, a period when proteinuria was already established, was still able to improve renal function, preserve renal structure and inhibit fibrogenic transcripts. In conclusion, our work demonstrates that the iNKT agonist GSL-1 modulates the pathogenesis of ADM-induced glomerulosclerosis and may provide an alternative approach to disease management.

**Citation:** Pereira RL, Reis VO, Semedo P, Buscariollo BN, Donizetti-Oliveira C, et al. (2012) Invariant Natural Killer T Cell Agonist Modulates Experimental Focal and Segmental Glomerulosclerosis. PLoS ONE 7(3): e32454. doi:10.1371/journal.pone.0032454

**Editor:** Maria Pia Rastaldi, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico & Fondazione D'Amico per la Ricerca sulle Malattie Renali, Italy

**Received:** May 27, 2011; **Accepted:** January 30, 2012; **Published:** March 12, 2012

**Copyright:** © 2012 Pereira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (n° 2007/07120-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (n° 501848/2009-6 and 484445/2010-3), Brazil. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Co-author NOSC is a PLoS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: ackeller.unifesp@gmail.com

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS) is a growing cause of adult nephrotic syndrome and chronic kidney disease. Although FSGS presents diverse histological patterns and etiological associations, podocyte injury is a common denominator [1]. The immunological mechanisms involved in the pathogenesis of FSGS are not fully understood, but various studies demonstrate an association between a Th2-like profile and disease development. Yap and colleagues were the first to demonstrate a correlation between increased IL-13 mRNA expression and idiopathic nephrotic syndrome (INS) during childhood; because FSGS is one of the most common causes of INS, it was considered an indication of the association between Th2 cytokines and FSGS

[2]. In the spontaneous FSGS Buffalo/Mna rat model, Le Berre and colleagues found an early imbalance in Th1/Th2 cytokines due to a T-cell infiltrate with a predominant Th2 profile, which in turn down-regulated Th1 responses [3]. Consistent with these results, Lai and colleagues demonstrated that IL-13 overexpression induced minimum change-like nephropathy, a phenomenon associated with podocyte structural changes and increased expression of IL-4R $\alpha$  and IL-13R $\alpha$ 2 in the glomeruli [4].

Combined, these previous studies support a correlation between Th2 cytokines and the development of FSGS. Because of the antagonism between Th1 and Th2 cytokines, we hypothesized that the polarization of immune responses toward a Th1 profile could inhibit or even modulate the pathogenesis of FSGS. In this

Review Article

## In Search of Mechanisms Associated with Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies for Acute Kidney Injury

Danilo C de Almeida,<sup>1,2</sup> Cassiano Donizetti-Oliveira,<sup>1</sup> Priscilla Barbosa-Costa,<sup>1</sup> Clarice ST Origassa,<sup>1</sup> \*Niels OS Câmara<sup>1,2</sup>

\*For correspondence: Professor Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, niels@icb.usp.br

<sup>1</sup>Department of Medicine, Division of Nephrology, Universidade Federal de São Paulo, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratory of Transplantation Immunobiology, Department of Immunology, Institute of Biomedical Science IV, Universidade de São Paulo, Brazil.

### Abstract

Acute kidney injury (AKI) is classically described as a rapid loss of kidney function. AKI affects more than 15% of all hospital admissions and is associated with elevated mortality rates. Although many advances have occurred, intermittent or continuous renal replacement therapies are still considered the best options for reversing mild and severe AKI syndrome. For this reason, it is essential that innovative and effective therapies, without side effects and complications, be developed to treat AKI and the end-stages of renal disease. Mesenchymal stem cell (MSC) based therapies have numerous advantages in helping to repair inflamed and damaged tissues and are being considered as a new alternative for treating kidney injuries. Numerous experimental models have shown that MSCs can act via differentiation-independent mechanisms to help renal recovery. Essentially, MSCs can secrete a pool of cytokines, growth factors and chemokines, express enzymes, interact via cell-to-cell contacts and release bioagents such as microvesicles to orchestrate renal protection. In this review, we propose seven distinct properties of MSCs which explain how renoprotection may be conferred: 1) anti-inflammatory; 2) pro-angiogenic; 3) stimulation of endogenous progenitor cells; 4) anti-apoptotic; 5) anti-fibrotic; 6) anti-oxidant; and 7) promotion of cellular reprogramming. In this context, these mechanisms, either individually or synergically, could induce renal protection and functional recovery. This review summarises the most important effects and benefits associated with MSC-based therapies in experimental renal disease models and attempts to clarify the mechanisms behind the MSC-related renoprotection. MSCs may prove to be an effective, innovative and affordable treatment for moderate and severe AKI. However, more studies need to be performed to provide a more comprehensive global understanding of MSC-related therapies and to ensure their safety for future clinical applications.

### Introduction

#### *Acute Kidney Injury*

Acute kidney injury (AKI) is classically described as a rapid and progressive loss of renal function, which persists for variable periods, resulting in an increase in markers of kidney injury.<sup>1</sup> It is important to consider that AKI is also characterised as a wide-spectrum syndrome, with progressive and cumulative damage ranging from mild to severe forms.<sup>1,2</sup>

AKI affects more than 15% of all hospital admissions and is associated with elevated rates of mortality and morbidity. In AKI, the mortality rate can range from 15% in patients with isolated renal failure up to 50–80% in severe cases in which

renal replacement therapies are needed.<sup>3,4</sup> Even after the recovery of kidney function, some patients remain dependent on dialysis (≈13%) or have compromised renal function in the long term. Indeed, it has been reported that patients who recover from acute renal dysfunction have an increased risk for developing progressive chronic kidney disease.<sup>5-7</sup>

#### *Pathophysiology of AKI*

AKI is frequently multifactorial and can occur as a result of a fall in renal perfusion, direct insults to the renal tubule (toxic or obstructive), tubule-interstitial inflammation and oedema, or a primary reduction in the glomerular filtration rate.<sup>8</sup> After an ischaemic injury to the kidney, structural and biochemical changes occur which result in vasoconstriction,

## 9.2 Prêmios

- *Melhor trabalho na forma de Oral - categoria: DOENÇA RENAL CRÔNICA, XVI Congresso Paulista de Nefrologia.2011*
- *Prêmio MAGALDI - 1º Lugar, SOCIEDADE DE NEFROLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO – XVI Congresso Paulista de Nefrologia. 2011*
- *HONRA AO MÉRITO, XXV REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL - FeSBE. 2010*
- *PRÊMIO PROFESSOR ERIC ROGER WROCLAWSKI - 1ºLUGAR, Albert Einstein Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa. 2010*
- *Melhor Trabalho Científico - Apresentação Pôster, V Congresso Brasileiro de Células Tronco e Terapia Celular, Associação Brasileira de Terapia Celular. 2010*