Camila Eleuterio Rodrigues

Células-tronco provenientes de cordão umbilical humano
atenuam a senescência renal induzida por injúria renal
aguda secundária à lesão de isquemia e reperfusão em
ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Nefrologia

Programa de Nefrologia

Orientadora : Profa. Dra. Lúcia da Conceição Andrade

SÃO PAULO

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Camila Eleuterio

Células-tronco provenientes de cordão umbilical humano atenuam a senescência renal induzida por injúria renal aguda secundária à lesão de isquemia e reperfusão em ratos / Camila Eleuterio Rodrigues. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.

Orientadora: Lúcia da Conceição Andrade.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Lesão renal aguda 3.Envelhecimento 4.Cordão umbilical 5.Telômero 6.MicroRNAs

USP/FM/DBD-051/15

RODRIGUES, C. E. **Células-tronco provenientes de cordão umbilical humano atenuam a senescência renal induzida por injúria renal aguda secundária à lesão de isquemia e reperfusão em ratos.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Nefrologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese à minha orientadora e amiga, Lúcia da Conceição Andrade, que sempre me estimulou a seguir em frente apesar de todas as dificuldades, e que me inspira todos os dias a ser uma pessoa melhor, dentro e fora da vida acadêmica.

Agradecimentos

À minha orientadora, **Lúcia da Conceição Andrade**, por me fazer perceber a imensidão que a ciência nos traz, por ter me acompanhado por todo esse longo caminho com suas sábias opiniões, por todo o apoio dentro e fora do laboratório: nos experimentos, nas atividades clínicas, nas confraternizações, nas adversidades da vida.

À amiga **Talita Rojas Cunhas Sanches**, que me ensinou quase tudo do que eu sei sobre técnicas experimentais, e que me mostrou que a vida pode ser muito mais simples e leve do que parece.

Ao amigo **Mauro Shigueharu Oide Júnior**, por ter me acompanhado sem hesitar em diversas etapas deste trabalho, pelos diversos conselhos e agradáveis discussões sobre células, medicina e lutas.

Às dras. **Maria Heloísa Massola Shimizu** e **Ana Carolina de Bragança Viciania**, sem as quais todo este projeto seria inviabilizado, pela ajuda imensurável em vários dos experimentos desenvolvidos neste estudo.

Ao dr. **Rildo Aparecido Volpini**, que me ensinou sobre técnicas de imunohistoquímica e possibilitou importantes resultados neste trabalho.

Aos colegas **José Manuel Córdor Capcha**, **Priscila Queiroz Gouveia**, **Amanda Gonçalves Pires** e **Rita de Cássia Cavaglieri**, por terem ampliado meus horizontes no universo da cultura celular e por serem exemplos dedicados de bons pesquisadores.

Ao colega **William Pereira Félix**, pela agradável companhia durante as culturas celulares, pelas conversas a respeito do sentido das coisas, e pelo imenso auxílio em algumas etapas dos meus experimentos.

À Profa. Dra. **Irene de Lourdes Noronha**, por ter aberto as portas de seu laboratório para nosso grupo, tornando possível o desenvolvimento de todos os experimentos envolvendo cultura celular, e pela compreensão de que o desenvolvimento científico também é competência de bons médicos nefrologistas.

À colega **Bárbara Amélia Aparecida Santana-Lemos**, por todo o ensinamento de técnicas laboratoriais e pelo exemplo de dedicação e amor à pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Rodrigo do Tocantins Calado**, por ter me recebido em seu laboratório em Ribeirão Preto com uma ótima equipe profissional, permitindo a realização de experimentos em telômeros que seriam muito improváveis sem a experiência de todo o grupo.

Aos colegas **Danilo Cândido de Almeida** e **Ênio José Bassi**, que sempre se puseram disponíveis para auxílio em diversos experimentos.

Ao Prof. Dr. **Niels Olsen Saraiva Câmara**, pelas orientações mais diversas possíveis sobre questões de imunologia celular, pelas ótimas aulas que ministrou ao longo de toda a minha formação, e pela ajuda contínua que fornece ao nosso grupo, disponibilizando pessoal, material e conhecimento sempre que temos alguma necessidade.

Ao Prof. Dr. **Bryan Eric Strauss** e ao pesquisador **Rodrigo Esaki Tamura**, pela contribuição com o anticorpo p16, e à pesquisadora **Tamaya Castro Ribeiro**, pelo auxílio com genes housekeeping para qPCR de microRNAs.

Aos Profs. Drs. **Marcelo Zugaib** e **Rossana Pulcineli Viera Francisco**, por terem possibilitado as coletas de cordões umbilicais para a obtenção das células de todo este estudo, e de outros que ainda estão em andamento.

À Profa. Dra. **Denise Maria Avancini Costa Malheiros**, sempre à disposição para ajudar e para ensinar diversos aspectos relacionados à patologia renal.

Ao Prof. Dr. **Oswaldo Keith Okamoto** e à colega **Marina Marçola Pereira de Freitas**, por me ajudarem a ampliar meus horizontes além das células-tronco mesenquimais.

À Profa. Dra. **Cláudia Maria de Barros Helou**, pelos ensinamentos e conselhos oferecidos durante toda esta etapa de aprendizado.

Às especialistas do biotério do ICB, **Nadia Koyama** e **Renaide Rodrigues Ferreira**, que me permitiram a aquisição de animais singênicos para todos os experimentos realizados neste projeto.

À colega **Denise Ariane de Jesus**, pelo cuidado com os animais, com o laboratório, e pela companhia em momentos diversos.

À chefe de serviço da comissão de pós-graduação da FMUSP, **Ângela Silva Guedes**, pela extrema competência e disponibilidade para ajudar.

Aos secretários da pós-graduação em nefrologia, **Pedro Henrique Pereira** e **Eliana Gonçalves**, pelo excelente trabalho que fazem em nosso serviço.

Ao meu pai, **José Roberto Rodrigues**, e à minha mãe, **Irene Eleuterio Rodrigues**, por terem desde cedo acreditado nos meus sonhos, e terem sempre me estimulado a continuar crescendo. Agradeço pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida, e por terem me ensinado os reais valores de uma pessoa. Verdadeiras inspirações para tudo o que eu faço.

À minha irmã, **Débora Eleutério Rodrigues**, pelos sábios conselhos que me ofereceu, e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, inclusive os mais árduos.

Ao meu companheiro **Roberto de Miranda Felizardo**, que me trouxe muita sorte e alegria durante o desenvolvimento deste trabalho. Pela companhia contínua em todos os momentos, e até mesmo pela ajuda cuidadosa com material biológico quando foi necessário.

A todas as **puérperas voluntárias** que doaram os cordões umbilicais de seus filhos recém-nascidos. Nem todos se tornaram células-tronco mesenquimais de sucesso, mas todos foram certamente muito importantes para o crescimento científico nessa área.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Resumo

Rodrigues CE. *Células-tronco provenientes de cordão umbilical humano atenuam a senescência renal induzida por injúria renal aguda secundária à lesão de isquemia e reperfusão em ratos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A injúria renal aguda representa um estado de senescência precoce induzida por estresse, e as células-tronco mesenquimais podem ser uma alternativa para seu tratamento. Células-tronco jovens reduzem o fenótipo de envelhecimento em rins quando comparadas a células idosas. O objetivo deste estudo foi avaliar se o tratamento com jovens células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano podem interferir na senescência renal induzida por lesão de isquemia-reperfusão em ratos. Ratos machos foram submetidos ao modelo de isquemia de artérias renais bilateralmente por 45 minutos, com reperfusão após, e alguns animais receberam 1×10^6 células por via intraperitoneal após 6 horas da indução da lesão. Os animais foram eutanasiados no segundo ou no sétimo dia pós-isquêmico. No segundo dia após a lesão de isquemia-reperfusão, o tratamento com as células melhorou a filtração glomerular e a função tubular, melhorou a expressão renal de aquaporina-2 e reduziu a infiltração de macrófagos nos rins. Proteínas relacionadas à senescência (β -galactosidase, p21, p16 e fator de transformação do crescimento β) e microRNAs (mir-29a e miR-34a) estiveram com a expressão aumentada após a isquemia-reperfusão, e houve redução nesses parâmetros com o tratamento. A redução na expressão de Klotho e o estado pró-oxidativo gerados pela isquemia-reperfusão também foram revertidos pelo tratamento. A senescência induzida pela injúria renal aguda é um processo independente de telômeros. Ao sétimo dia pós-lesão, os ratos isquêmicos mantinham defeito de concentração urinária, que foi revertido nos animais tratados. Além disso, o tratamento reduziu o índice de necrose tubular aguda em tecido renal e reduziu o infiltrado macrofágico túbulo-intersticial. O marcador pró-senescência p16 foi completamente restabelecido nos animais tratados. Nossos dados demonstram que o tratamento com jovens células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano atenua a resposta

inflamatória e de estresse oxidativo que ocorre na injúria renal aguda, e reduz a expressão de proteínas e microRNAs relacionados à senescência. Nossos achados expandem as perspectivas para o tratamento da injúria renal aguda.

Descritores: Células-tronco; Lesão renal aguda; Envelhecimento; Cordão umbilical; Telômero; microRNAs.

Abstract

Rodrigues CE. *Human umbilical cord derived stem cells attenuate ischemic acute kidney injury-induced premature senescence in rats* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Acute kidney injury represents a status of premature stress-induced senescence, and mesenchymal stem cells are an alternative for treatment. Young stem cells reduce aging phenotype in kidneys when compared to old cells. The objective of this study was to evaluate if treatment with young human umbilical cord mesenchymal stem cells could interfere in kidney senescence induced by renal ischemia-reperfusion in rats. Male rats were induced to ischemia-reperfusion injury by 45-minutes clamping of both renal arteries; some rats received 1×10^6 cells intraperitoneally six hours later. Rats were euthanatized on post-renal ischemia reperfusion days two and seven. At day 2 after ischemia-reperfusion injury, treatment with cells improved glomerular filtration, tubular function, improved renal expression of aquaporin 2 and decreased macrophage kidney infiltration. Senescence-related proteins (β -galactosidase, p21, p16 and transforming growth factor β) and microRNAs (miR-29a and miRNA-34a) were overexpressed after ischemia-reperfusion, and reversed by the treatment. The Klotho reduced expression and the pro-oxidative status induced by ischemia-reperfusion were reversed by the treatment. Senescence induced acute kidney injury is a telomere-independent process. At day 7, ischemic rats maintained urinary concentrating defect, which is reversed in treated animals. Moreover, treatment decreased the index of acute tubular necrosis in kidney tissue and decreased macrophage kidney infiltration. Senescence marker p16 was completely restored in treated animals. Our data

demonstrate that young human umbilical mesenchymal stem cells treatment attenuates the inflammatory and oxidative stress response occurring in acute kidney injury, and reduces the protein and microRNA expression related to senescence. Our findings broaden the perspectives for the treatment of AKI.

Descriptors: Stem cells; Acute kidney injury; Aging; Umbilical cord; Telomere; microRNAs

Lista de abreviaturas e siglas

APC: alofococianina

AQP2: aquaporina 2

ASN: American Society of Nephrology

β gal: β -galactosidase

CD: “cluster” (grupo) de diferenciação

CDK: quinase dependente de ciclina

cDNA: DNA complementar

chCTM: células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano

CDP-star: substrato de fosfatase alcalina utilizado para gerar cor no ensaio de imunoeletroforese de DNA para determinação de comprimentos de telômeros

Ct: “cycle threshold”, limiar do ciclo de qPCR

CT: célula-tronco

CTH: células-tronco hematopoiéticas

CTM: células-tronco mesenquimais

CTM2: grupo de ratos submetidos ao modelo de isquemia e reperfusão renal e tratados com 1×10^6 células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano diluídas em 2mL de soro fisiológico após 6h da cirurgia, com infusão IP, com eutanásia após 2 dias da lesão

CTM7: grupo de ratos submetidos ao modelo de isquemia e reperfusão renal e tratados com 1×10^6 células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano diluídas em 2mL de soro fisiológico após 6h da cirurgia, com infusão IP, com eutanásia após 7 dias da lesão

D2: segundo dia após a indução da lesão de isquemia e reperfusão renal

D7: sétimo dia após a indução da lesão de isquemia e reperfusão renal

DAB: diaminobenzidina

DIG: digoxigenina

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

ELISA: ensaio imunossorvente ligado a enzima

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

EROs: espécies reativas de oxigênio

EV: endovenoso

FENa: fração de excreção de sódio

FGF: fator de crescimento de fibroblasto

FRT: fragmento de restrição telomérica

HLA: antígeno leucocitário humano

HO-1: heme-oxigenase-1

ICAM: molécula de adesão intercelular

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1

IGFBP-7: proteína ligadora de fator de crescimento semelhante à insulina-7

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

IP: intraperitoneal

IR: isquemia e reperfusão renal

IR2: grupo de ratos submetidos ao modelo de isquemia e reperfusão renal sem tratamento celular, com eutanásia após 2 dias da indução da lesão

IR7: grupo de ratos submetidos ao modelo de isquemia e reperfusão renal sem tratamento celular, com eutanásia após 7 dias da indução da lesão

IRA: injúria renal aguda

Kb: quilobases (equivale a mil bases de nucleotídeos)

KDa: quilodáltons

miR: microRNA

MnSOD: superóxido dismutase de manganês

NK: “natural killer”, tipo de célula da imunidade inata

NTA: necrose tubular aguda

P: passagem (corresponde a um processo de tripsinização em cultura celular)

PAS: ácido periódico-Schiff

PE: ficoeritrina

PBS: tampão fosfato-salino

PCNA: antígeno nuclear de células em proliferação

PCR: reação em cadeia da polimerase

qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa

Rb: retinoblastoma

RNA: ácido ribonucleico

SB: Southern blot (imunoeleetroforese de DNA)

SFB: soro fetal bovino

SOD: superoxidodismutase

SSC: tampão salina-sódio-citrato

TAE: tampão tris-acetato-EDTA

TERT: telomerase transcriptase reversa

TIMP-1: proteína inibidora tecidual das metaloproteinases-1

TGF β : fator de transformação do crescimento β

TNF: fator de necrose tumoral

TLR: receptor semelhante a toll

TRAP: protocolo de amplificação de repetições teloméricas

TBS: tampão Tris

TMB: tetrametilbenzidina, substrato de peroxidase utilizado para gerar cor no ensaio de atividade intrínseca da telomerase

VCAM: molécula de adesão da célula vascular

WB: Western blot (imunoeletroforese de proteína)

WKY: Wistar-Kyoto

Lista de figuras

Figura 1: Representação da recuperação renal após lesão de isquemia-reperfusão.....	25
Figura 2: Visão geral da inflamação gerada pela perfusão pós-isquêmica.....	30
Figura 3: Anatomia dos túbulos renais.....	31
Figura 4: Principais proteínas inibidoras do ciclo celular.....	45
Figura 5: Origens das células-tronco.....	48
Figura 6: Mecanismos de ação das células-tronco.....	51
Figura 7: Delineamento geral do protocolo de pesquisa.....	63
Figura 8: Modelo animal de isquemia e reperfusão renal.....	65
Figura 9: Extração de células-tronco mesenquimais a partir da geléia de Wharton de cordão umbilical humano	68
Figura 10: Mr.Frosty®, equipamento para congelamento celular programado	69
Figura 11: Reação de imuno-histoquímica.....	77
Figura 12: Avaliação da integridade do DNA.....	82
Figura 13: Experimento de transcrição reversa e qPCR.....	88
Figura 14: Quantificação da expressão gênica por análise de qPCR.....	90
Figura 15: Southern blot para análise de comprimento de telômeros.....	92
Figura 16: Análise da porcentagem de telômeros em diferentes intervalos de comprimento.....	94
Figura 17: Ensaio para quantificar a atividade intrínseca de telomerase.....	97
Figura 18: Caracterização das células cultivadas.....	99
Figura 19: Curvas de uréia.....	102
Figura 20: Evolução dos parâmetros de função renal.....	104

Figura 21: Diurese do segundo dia pós-isquemia.....	106
Figura 22: Expressão de AQP2 em fração de proteínas de membranas de tecido renal.....	109
Figura 23: Avaliação histomorfométrica renal.....	110
Figura 24: Infiltração macrófágica em tecido renal.....	113
Figura 25: Infiltração linfocitária em tecido renal.....	115
Figura 26: Marcadores de senescência.....	117
Figura 27: Expressão de enzimas anti-oxidantes (HO-1 e MnSOD) em tecido renal.....	121
Figura 28: Proliferação tubular.....	123
Figura 29: Avaliação do comprimento de telômeros por análise da média do fragmento de restrição telomérica.....	124
Figura 30: Atividade de telomerase intrínseca renal.....	126

Lista de tabelas

Tabela 1 - Sequências dos primers utilizados nas reações de qPCR.....	86
Tabela 2 - Análise clínica e bioquímica de função renal no segundo dia pós-isquemia.....	105
Tabela 3 - Avaliação do comprimento de telômeros por análise da proporção de telômeros curtos, médios e longos.....	125

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Lesão de isquemia e reperfusão renal.....	24
1.1.1. Epidemiologia da IRA por IR.....	27
1.1.2. Inflamação e alterações imunológicas.....	29
1.1.3. O papel do estresse oxidativo.....	31
1.1.4. Terapias utilizadas para tratamento da IR na atualidade.....	33
1.2. Senescência.....	35
1.2.1. Telômeros e telomerase.....	36
1.2.2. Senescência induzida por estresse oxidativo.....	39
1.2.3. O papel da proteína Klotho.....	40
1.2.4. microRNAs e senescência.....	42
1.2.5. Proteínas relacionadas ao ciclo celular.....	44
1.3. Células-tronco mesenquimais	47
1.3.1. Mecanismos de ação.....	50
1.3.2. Células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano.....	54
2. OBJETIVOS.....	57
2.1. Objetivo geral	57
2.2. Objetivos específicos.....	57
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
3.1. Considerações gerais - a escolha do melhor modelo.....	58
3.2. Desenho do estudo.....	61
3.3. Modelo animal de isquemia e reperfusão.....	64

3.4. Isolamento e caracterização das células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano.....	66
3.4.1. Imunofenotipagem	71
3.4.2. Ensaios de diferenciação.....	72
3.5. Aplicação das células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano.....	73
3.6. Função renal e tubular.....	74
3.6.1. Parâmetros clínicos e bioquímicos.....	74
3.6.2. Avaliação histológica de lesão tubular.....	76
3.7. Estudo de imuno-histoquímica de infiltração leucocitária e proliferação em tecido renal.....	77
3.8. Preparo para técnicas mais avançadas.....	80
3.8.1. Técnica de extração de proteínas totais e de membrana do tecido renal.....	80
3.8.2. Técnica de extração de DNA do tecido renal.....	81
3.8.3. Técnica de extração de RNA total enriquecido em pequenos RNAs.....	83
3.9. Avaliação da expressão de proteínas e miRs em tecido renal.....	84
3.9.1. Western blot (imunoeletroforese de proteína).....	84
3.9.2. qPCR.....	86
3.10. Avaliação de parâmetros de senescência replicativa.....	91
3.10.1. Ensaio para medição do comprimento de telômeros.....	91
3.10.2. Estudo para avaliar a atividade de telomerase intrínseca.....	95
3.11. Análise estatística.....	98
4. RESULTADOS.....	99
4.1. Caracterização das células-tronco mesenquimais	99
4.2. Função renal e tubular.....	100
4.2.1. Parâmetros clínicos e bioquímicos.....	100

4.2.2. Expressão de AQP2.....	108
4.2.3. Avaliação histológica de lesão tubular.....	110
4.3. Estudo de imuno-histoquímica de infiltração leucocitária em tecido renal	112
4.3.1. Infiltração macrofágica.....	112
4.3.2. Infiltração linfocitária.....	114
4.4. Avaliação da expressão de marcadores de senescência.....	116
4.5. Estudo da expressão de enzimas associadas ao estresse oxidativo.....	120
4.6. Avaliação da proliferação de células tubulares.....	122
4.7. Análise de parâmetros de senescência replicativa.....	124
4.7.1. Comprimento de telômeros.....	124
4.7.2. Atividade de telomerase intrínseca.....	126
5. DISCUSSÃO	127
5.1. Considerações sobre o modelo de IR.....	128
5.2. Considerações sobre o uso das chCTM.....	130
5.3. A IR leva a dano renal predominantemente tubular.....	132
5.4. A IR promove desbalanço oxidativo e leva à senescência renal precoce.....	133
5.5. Há aumento da proliferação celular em todos os grupos submetidos à IR.....	135
5.6. O tratamento com chCTM reduz a lesão renal em ratos isquêmicos.....	136
5.7. A infiltração leucocitária é afetada na IR, e parcialmente modulada com o uso de chCTM.....	137
5.8. As chCTM reduziram vias de estresse oxidativo e senescência por mecanismos independentes de telômeros.....	138
5.9. As chCTM não interferem na proliferação tubular pós-isquêmica.....	140
6. CONCLUSÕES.....	141
7. REFERÊNCIAS.....	142
8. ANEXOS.....	163

8.1. Pôsteres relacionados ao estudo em questão, apresentados em congressos...	163
8.2. Produção científica.....	168
9. APOIO FINANCEIRO.....	175

INTRODUÇÃO

1.1. Lesão de isquemia e reperfusão renal

A lesão de isquemia e reperfusão renal (IR) se caracteriza por intensa lesão tubular, em que sua principal expressão histológica é a necrose tubular aguda (NTA). Nela há perda de polaridade e destacamento das células a partir dos túbulos ^{1; 2; 3}, frequentemente havendo obstrução luminal por debris celulares (figura 1). Apesar de a reperfusão ser essencial para a sobrevivência do tecido isquêmico, ela é capaz de trazer ao tecido lesado células inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROs), que levarão a lesão celular adicional, principalmente no compartimento túbulo-intersticial renal ⁴, local de maior acometimento orgânico.

Os rins possuem capacidade de regeneração após lesões agudas tóxicas e isquêmicas, por meio de migração e proliferação de células sobreviventes para a membrana basal desnuda dos segmentos tubulares lesados ^{1; 5}. Células-tronco derivadas de medula óssea podem ser encontradas em compartimento intersticial e em capilares peritubulares após uma situação de lesão renal, mas elas não constituem novas células tubulares em regeneração ⁶. A repopulação dos túbulos acontece primariamente a partir da proliferação de células tubulares epiteliais que foram lesadas e desdiferenciaram ^{6; 7; 8} (figura 1).

Figura 1: Representação da recuperação renal após lesão de isquemia-reperfusão: as células tubulares submetidas à IR perdem a polaridade, com morte de algumas células, obstrução tubular com debris e restos celulares, levando a perda de função tubular e de filtração. Células viáveis residentes do próprio rim são capazes de se dediferenciar, proliferar e rediferenciar para repopular o órgão e trazer a recuperação da disfunção renal. Adaptado de referência ⁹.

O modelo animal de IR pode ser realizado em diversas apresentações, e a isquemia pode envolver todo o pedículo renal ou apenas os componentes arteriais, pode ser bilateral ou unilateral, e, neste caso, acompanhando nefrectomia contra-lateral ou não. Sua variação de isquemia bilateral é um modelo muito comumente utilizado, pois é considerado relevante por simular condições patológicas humanas em que o fluxo sanguíneo é afetado em ambos os rins, como é o caso de redução do débito cardíaco ou cirurgias que envolvam a aorta supra-renal. Trata-se de um modelo complexo, que depende de muitas variáveis que podem interferir em seu resultado final.

A susceptibilidade das diversas espécies animais ao insulto isquêmico é diferente, havendo possibilidade de variação de resposta clínica dentro de uma mesma espécie caso os animais pertençam a cepas distintas. Até mesmo entre diferentes colônias de uma mesma cepa já se notou variação na resposta clínica à lesão de IR ¹⁰. Em geral, modelos isquêmicos em ratos são um pouco mais estáveis e homogêneos que aqueles realizados em camundongos ¹⁰.

O tempo de isquemia realizado também é fator importante, e deve ser individualizado para o animal com que se trabalha. Em camundongos, isquemias de 45 minutos podem ser letais ¹, enquanto isquemias renais de 30 minutos levam a aumento de creatinina já nas primeiras 24h. Em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), a lesão de isquemia bilateral por 45 minutos seguida de reperfusão é bem tolerada, e leva à IRA após 6 horas da liberação dos clamps, demonstrada por aumento de creatinina e uréia, e por lesão histológica renal, assim como por maior fração de excreção de sódio ^{11; 12}. Ratos Fischer 344 submetidos a isquemia por 38 minutos têm o pico de função renal após 3 dias de lesão, sendo que após uma semana a função renal já se apresenta praticamente de volta à normalidade ¹³.

Além desse, outros fatores podem interferir na lesão renal que será gerada por esse modelo, como o tempo de cirurgia, que interferirá no grau de desidratação do animal, e a temperatura do animal. Tanto a temperatura ambiente como a do leito cirúrgico devem ser controladas ¹⁰, pois sabe-se que a hipotermia é fator importante de resistência à lesão isquêmica, podendo conferir papel protetor renal ^{14; 15; 16; 17}.

Dessa forma, o ideal é que se trabalhe com animais o mais semelhantes possível, e que os grupos sejam submetidos ao procedimento cirúrgico nas condições mais semelhantes que se conseguir. O pesquisador deve investigar em seu projeto qual o tempo de isquemia ideal para seu animal, e qual a evolução esperada para aquele modelo. Assim, a chance de sucesso com o modelo de IR torna-se maior.

1.1.1. Epidemiologia da IRA por IR

A IR acontece em diversas doenças em humanos, como cirurgias cardíacas e de correção de aneurisma de aorta, insuficiências cardíacas descompensadas ou situações de transplante renal. Até 25% dos paciente submetidos a cirurgia corretiva de aneurisma de aorta podem evoluir com injúria renal aguda ¹⁸.

Em pacientes internados em unidade de terapia intensiva, a incidência de IRA pode variar de cerca de 5 até mais de 10% ^{19; 20}. No Brasil, a prevalência de IRA em UTI era de 4,8% no ano de 2005, com mortalidade intra-hospitalar próxima de 77%, uma das mais altas no mundo ¹⁹. A isquemia renal é causa muito comum de IRA ²¹, e cerca de 30% de todas as injúrias renais agudas em ambiente de terapia intensiva podem ser consequência de alterações hemodinâmicas ²². A IRA isquêmica aumenta em 10 a 15 vezes o risco de morte em pacientes, de forma independente de outras variáveis ^{23; 24}.

Estudos epidemiológicos e de ciência básica recentes têm apontado para uma correlação causal entre o desenvolvimento de IRA e progressão futura para doença renal crônica ²⁵. Pacientes com IRA que necessitam de diálise têm aumento de chance de mais de três vezes de desenvolver doença renal crônica em estadio terminal do que controles pareados ²⁶. Um único episódio de IRA dialítica eleva em 28 vezes o risco de desenvolvimento de doença renal crônica avançada, aumentando o risco de mortalidade em duas vezes ²⁷. Há estimativas de que até um quarto do aumento na prevalência de doença renal crônica em estadio terminal ocorrido entre 1988 e 2002 possa ser atribuído à IRA ²⁸.

A incidência de IRA no mundo é de aproximadamente 2000 pessoas por milhão de habitantes, e destes, apenas metade sobrevive à doença ²⁹. Dos sobreviventes, cerca de 15% evolui com doença renal crônica avançada em até dois anos ²⁹.

Dessa forma, percebe-se que a IRA é um grave problema de saúde pública, e diversas são as condições que levam a ela. A lesão de IR é uma

causa importante de IRA, e merece grande atenção quanto à busca por melhores tratamentos.

1.1.2. Inflamação e alterações imunológicas

A IR se caracteriza por reação de inflamação precoce, independente de aloantígeno³⁰. As respostas do epitélio tubular durante a lesão renal, como a sinalização via receptores semelhantes a toll (TLRs), são bem parecidas com a resposta inata desencadeada por um quadro de infecção urinária ascendente³⁰; ³¹. Os TLRs podem ser ativados por ligantes endógenos, como a proteína do choque tóxico e produtos de degradação celular gerados após a lesão. A IR leva à produção de biglicans solúveis que são capazes de ativar TLR2 e TLR4, o que leva à produção do fator pró-inflamatório de transcrição NF- κ B, com aumento da produção de citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) α ³² e migração de células imunes, com perpetuação da resposta inflamatória^{1; 33; 34}. Camundongos deficientes em TLR2 e TLR4 apresentam menor produção de citocinas quando comparados a camundongos selvagens, e isto faz com que a disfunção renal secundária à lesão de IR, representada pelo aumento de creatinina sérica, seja menor³².

Ratos submetidos a IR apresentam maior expressão renal de CX3CL1, um fator de quimiotaxia para macrófagos, e isto faz com que haja grande infiltração renal de células positivas para CD68 logo após o insulto isquêmico³⁵. Na realidade, na IRA pós-isquêmica, a maioria das células do infiltrado inflamatório são monócitos e macrófagos, representando cerca de 60% das células inflamatórias encontradas no tecido lesado. Os monócitos infiltram o tecido, maturam e se diferenciam em macrófagos residentes, que podem proliferar e ampliar a resposta inflamatória local³⁶. Macrófagos positivos para óxido nítrico sintase induzível (iNOS), de fenótipo M1, são recrutados aos rins nas primeiras 48 horas após a lesão de IR, enquanto macrófagos de perfil M2, não-inflamatórios e positivos para arginase-1 e para receptor de manose, predominam mais tardiamente. O aparecimento de macrófagos M2 se correlaciona com a fase de proliferação e reparo renal³⁷. Estudos *in vitro* mostram que macrófagos pró-inflamatórios estimulados com interferon γ , quando co-cultivados com células tubulares renais, começam a expressar marcadores de macrófagos M2, demonstrando a importância da interação celular na recuperação da IRA³⁷.

Além do epitélio tubular, o endotélio também participa na resposta imune pós-isquêmica. Há ativação de células endoteliais, com aumento da permeabilidade vascular e expressão de diferentes moléculas de adesão, que permitem o recrutamento e a infiltração de células efetoras no tecido renal. A perda das propriedades antiadesivas das células endoteliais leva ao desenvolvimento de superfícies trombogênicas, e os leucócitos aderentes liberam espécies reativas de oxigênio (EROs), ativando uma via alternativa de lesão renal.

A resposta inflamatória aguda leva à disfunção renal e, eventualmente, à falência orgânica ³⁶. A figura 2 resume os principais aspectos da resposta inflamatória imune que se segue à lesão de IR.

Figura 2 : Visão geral da inflamação gerada pela perfusão pós-isquêmica: o insulto isquêmico acontece primeiro, e então a reperfusão inicia a inflamação, com a entrada de sangue contendo ligantes endógenos que estimularão a resposta imune inata e os principais componentes celulares responsáveis por essa resposta. Há ativação de TLRs, com geração de citocinas e recrutamento leucocitário. Neutrófilos, macrófagos e linfócitos, invadem o rim pós-isquêmico. Citocinas e o sistema complemento também contribuem para a lesão renal. Os eventos da lesão acontecem em nível microvascular e, após, no espaço tubular intersticial. A microcirculação renal também é afetada pela adesão e obstrução por leucócitos e plaquetas. Adaptado de referência ³⁰.

1.1.3. O papel do estresse oxidativo

O modelo isquêmico de IRA é frequentemente acompanhado pela geração de EROs, principalmente durante o período de reperfusão, levando à peroxidação lipídica que contribui para a lesão tecidual. A IR estimula o fator de transcrição denominado Nfr2, que induz a produção de heme-oxigenase-1 (HO-1), responsável por estimular a enzima superóxido dismutase de manganês (MnSOD) via produção de monóxido de carbono. Nfr2, HO-1 e MnSOD são fatores antioxidantes que ajudariam a contra-balancear o excesso de EROs gerado pela lesão de IR.

O túbulo proximal é particularmente susceptível a lesão de IR ¹². Neste túbulo, três segmentos morfológicamente distintos são reconhecidos: S1, S2 e S3. A porção inicial do túbulo, que atinge até 1/3 da parte convoluta é o segmento S1. O segmento S2 representa o restante da parte convoluta e o início da parte reta, e o segmento S3 representa o restante da parte reta ³⁸ (figura 3). A vasa recta, que nutre os túbulos renais, tem conformação em alça, que permite que haja passagem de oxigênio a partes mais distais do túbulo sem que ele chegue à extremidade da alça (figura 3). Dessa forma, a tensão de oxigênio decresce em direção à papila, o que faz com que a parte reta do túbulo proximal esteja permanentemente à beira da hipóxia.

Figura 3: Anatomia dos túbulos renais: o túbulo proximal é composto pelas porções S1, S2 e S3. S1 é o primeiro terço da parte convoluta, S2 são os 2/3 finais da parte convoluta mais o início da parte reta, e o S3 é o restante da parte reta. A vasa recta nutre os túbulos renais, e tem conformação em alça, fazendo com que os segmentos S2 e S3 estejam permanentemente à beira da hipóxia.

O segmento S1 do túbulo proximal contém células que expressam TLR4, um dos principais iniciadores da lesão celular tubular. Entretanto, há no segmento S1 agentes anti-oxidantes, como as enzimas HO-1 e Sirt1, o que protege este segmento da lesão principal ³⁹. Dessa forma, os segmentos S2 e S3, desprovidos de proteção contra EROs e mais susceptíveis à isquemia por conta de sua anatomia sem reserva de suprimento sanguíneo, são os mais acometidos pela IR.

1.1.4. Terapias utilizadas para tratamento da IR na atualidade

Existem três momentos em que se pode atuar para a redução do impacto da IRA: na sua prevenção, no tratamento após seu início, e na redução da progressão para doença renal crônica uma vez que a IRA se estabeleceu ²⁹.

Atualmente, algumas medidas já são conhecidas como benéficas em algum desse três momentos, mas poucas delas representam tratamento específico para a IRA já instalada.

O “KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury” ⁴⁰ é um documento que orienta algumas diretrizes clínicas para o manejo e prevenção da IRA. Em suas orientações, há recomendações para otimização clínica e hemodinâmica de doentes graves ou sob risco de lesão renal, como uso adequado de oxigenioterapia e de vasopressores em situações de choque, o que pode levar à melhora da perfusão orgânica e menor incidência de disfunção renal. Há orientações quanto à tentativa de reduzir o uso de medicações nefrotóxicas em situações de risco renal, com ajuste de doses de medicações sempre que houver alteração na taxa de filtração glomerular. O uso de diuréticos é uma opção para o manejo de volume em pacientes ainda em tratamento conservador, mas não é capaz de prevenir ou tratar a IRA. Outras medicações previamente testadas como possíveis tratamento de injúria renal aguda não tiveram sucesso clínico, e portanto não devem ser utilizadas. Alguns exemplos delas são a dopamina em baixas doses, o fenoldopam ou o peptídeo natriurético atrial ⁴⁰.

Algumas etiologias de IRA podem ter profilaxia e tratamento específicos. Na IRA por contraste ⁴¹, na rabdomiólise ⁴², em síndrome de lise tumoral ⁴³ e em situações de desidratação, a hidratação com salina isotônica já se mostrou eficaz como medida de prevenção. Em síndrome hepato-renal, o uso de albumina já se mostrou benéfico tanto como profilaxia quanto como tratamento ^{44; 45; 46}. Entretanto, na maioria dos casos, após instalada a disfunção, o que conseguimos oferecer é apenas suporte clínico e manejo de complicações. À falência renal sem perspectiva de recuperação a curto prazo, podemos oferecer um dos principais tratamentos nefrológicos da atualidade: a terapia renal substitutiva, que, entretanto, é apenas mais uma forma de terapia de suporte.

Quando analisamos a proporção de pacientes com diagnóstico de IRA e necessidade de diálise, notamos que esta incidência aumentou em quatro vezes entre os anos 1996 e 2010. Apesar de a mortalidade à ela relacionada ter sido menor neste período, a taxa de dependência de diálise nos pacientes sobreviventes não reduziu ao longo do tempo ⁴⁷. Assim, percebe-se uma necessidade urgente de novos tratamentos para esta condição.

Existem alguns estudos recentes que vêm testando outras alternativas de tratamento renal em situações de injúria aguda. Dentre essas medicações, vem sendo testado o hormônio estimulante de melanócito α , que tem propriedades anti-inflamatórias e anti-apoptóticas, com bons resultados para proteção renal em IRA em modelos experimentais ^{48; 49} e em estudo clínico inicial ³⁴. Da mesma forma, RNA silenciador da proteína p53 ⁵⁰, agonistas de proteínas morfogenéticas ósseas ⁵¹ e fosfatase alcalina ⁵², capazes de reduzir respostas de inflamação e de apoptose, também demonstraram bons resultados em IRA experimental, já estando em teste em estudos clínicos, ainda sem resultados.

As células-tronco mesenquimais aparecem nesse contexto como medida promissora para o tratamento de IRA, pois podem atuar em diversas vias da fisiopatologia da disfunção orgânica. Com ação parácrina e endócrina, as células produzem fatores de crescimento e citocinas, são capazes de transferência de RNA e podem, dessa forma, modular a resposta imune, além de ter ações anti-apoptóticas, anti-inflamatórias e pró-angiogênicas ²⁹.

1.2. Senescência

A senescência celular é marcada por um aumento no processo de autofagia⁵³, que é o processo responsável pela degradação de organelas lesadas e de agregados proteicos intra-celulares. A IRA também pode ser responsável pelo aumento da atividade autofágica em células tubulares^{54; 55}, e sabe-se que a ausência de autofagia nessas células pode levar à piora de função renal após lesão de IR, com aumento de apoptose e de proliferação celulares⁵⁶. Mesmo em situação fisiológica, a ausência de atividade autofágica leva ao acúmulo de marcadores de estresse oxidativo⁵⁶.

O processo de autofagia se acompanha de aumento no compartimento lisossomal e exposição de uma substância presente nos lisossomos conhecida como β -galactosidase (β gal), um importante marcador de senescência celular. Mesmo que histologicamente normais, rins que envelhecem apresentam maior expressão de β gal e de proteína p16⁵⁷, além de apresentarem maior expressão da proteína pró-fibrótica fator de transformação do crescimento (TGF) β ⁵⁸.

As situações de IRA levam a alterações renais que remetem a um fenótipo de senescência celular, como superexpressão de proteínas inibidoras do ciclo celular^{59; 60} e supressão na expressão da proteína Klotho⁶¹. A seguir, serão discutidos alguns mecanismos específicos relacionados ao processo de senescência celular.

1.2.1. Telômeros e telomerase

Telômeros são longas sequências TTAGGG repetidas no final dos cromossomos, que não são codificadoras. A enzima telomerase é a responsável pela manutenção dos telômeros, fazendo a adição dessas repetições teloméricas. A atividade de telomerase é capaz de marcar o potencial de alongamento dos telômeros nas diferentes espécies, sendo que a telomerase é muito mais ativa em roedores que em seres humanos ⁶², o que faz com que o telômero humano tenha apenas cerca de 20 quilobases (kb) em extensão ⁶³, enquanto um telômero de rato varia entre 20 e 100 kb ^{64; 65}. Em humanos, a telomerase é expressa em células-tronco (CTs) embrionárias e adultas, e também em células altamente proliferativas, como células germinativas, pele, intestino e medula óssea, mas não na maioria das outras células somáticas ^{66; 67; 68}.

A cada divisão celular, os telômeros se encurtam, pois existe a perda de 50 a 100 pares de bases de ácido desoxirribonucleico (DNA) a cada ciclo de divisão ^{69; 70}, o que os torna um marcador de senescência replicativa celular ⁶⁶. Quando há alta proliferação celular aumentando a chance de senescência replicativa, há mecanismos compensatórios que levam à tentativa de redução da proliferação. O encurtamento dos telômeros leva à ativação de vias de lesão do DNA, com aumento da regulação da proteína p21, inibidora do ciclo celular ^{71; 72}. Além disso, a deleção de p21 prolonga o tempo de vida de camundongos deficientes de telomerase ⁷², pois impede que haja replicação excessiva e redução nos comprimentos dos telômeros.

A disfunção telomérica está relacionada a diversas desordens da medula óssea, como anemia aplásica, síndrome mielodisplásica e doenças malignas hematopoiéticas ⁶⁶. O desgaste telomérico também já foi implicado em disfunção cardiovascular e progressão de injúria renal aguda ⁷³. A incapacidade de manutenção dos telômeros parece estar associada a menor capacidade regenerativa após a IRA isquêmica ⁷¹. Camundongos deficientes em telomerase, quando submetidos a lesão de IR, têm maior grau de disfunção renal e maior extensão de lesão histológica em rins quando comparados a animais com maior atividade de telomerase ⁷¹.

A telomerase pode ser ativada em situações de estresse oxidativo, em mecanismo que tenta preservar os comprimentos dos telômeros após insulto. Em modelo de sobrecarga de ferro e lesão hepática em ratos, já foi demonstrado que a atividade de telomerase aumenta com a ativação de vias de estresse oxidativo, apesar de isso não influenciar o comprimento de telômeros em tecido hepático a médio prazo ⁷⁴. Entretanto, se a lesão for muito grave, a telomerase pode não agir. Em camundongos submetidos a isquemia de pedículos renais bilateral por diferentes tempos (10, 20, 30 e 45 minutos), com reperusão e análise após 3, 24 e 48h, a expressão da telomerase foi avaliada em tecido renal. Apenas nos animais submetidos a isquemias curtas (até 20 minutos) houve aumento da regulação da telomerase nos rins ⁵⁹.

Outros fatores podem influenciar o comprimento dos telômeros nas células, como, por exemplo a prática de exercício moderado ⁷⁵ e a restrição calórica ⁷⁶, capazes de reduzir a velocidade de encurtamento precoce dos telômeros por estarem associados a aumento de defesas anti-oxidantes.

A restrição alimentar estende a expectativa de vida de diversas espécies e reduz a incidência de doenças associadas ao envelhecimento, podendo reduzir a senescência celular, com melhor manutenção de comprimento telomérico sem aumento da atividade da telomerase, mesmo se iniciada à idade adulta ⁷⁷. A restrição dietética é capaz de promover melhora da função mitocondrial, levando, assim, à redução em marcadores de estresse oxidativo ⁷⁷.

A dieta mediterrânea tradicional é composta por grandes quantidades de vegetais, frutas, nozes e castanhas, legumes e grãos integrais, além de grande uso de azeite de oliva e baixo consumo de gorduras saturadas. Peixes são consumidos em quantidade moderadamente alta e laticínios, carnes e aves são evitados nessa dieta. Além disso, consta na dieta mediterrânea um consumo moderado, mas regular, de vinho às refeições ⁷⁸. A maior aderência à dieta mediterrânea esteve associada a maior comprimento de telômeros em leucócitos periféricos em estudo de coorte que envolveu mais de 4500 participantes saudáveis ⁷⁹. Dessa forma, a manutenção de um estilo de vida

saudável pode levar à melhor manutenção dos telômeros, com redução da senescência celular replicativa.

A senescência celular pode, entretanto, acontecer de forma alternativa: além da senescência replicativa, dependente de telômeros, já se conhece também a senescência induzida por estresse, independente de telômeros. A senescência induzida por estresse pode ser ativada principalmente por dano no DNA, atividade de oncogenes ou EROs levando à ativação de vias de estresse oxidativo celular.

1.2.2. Senescência induzida por estresse oxidativo

A senescência induzida por estresse é classicamente ativada por EROs, e sabe-se que substâncias anti-oxidantes são capazes de retardá-la⁸⁰. Quando há dano mitocondrial, há produção de grandes quantidades de EROs⁸¹, ativando mecanismo de autofagia celular⁸² e levando à exposição de β gal⁸³.

A apigenina é substância capaz de induzir senescência celular⁸⁴, pois leva a dano mitocondrial que promove aumento importante de EROs⁸⁵. Células estimuladas com apigenina e peróxido de hidrogênio têm aumento de apoptose e de marcadores de senescência, e os danos podem ser reduzidos com o uso da substância anti-oxidante n-acetil-cisteína⁸⁵.

O consumo de soja, independentemente do conteúdo calórico total, também já foi reconhecido como fator de inibição de senescência^{86; 87}. Uma possível explicação para isso encontra-se no fato de a soja conter substâncias, como a isoflavona, capazes de inibir vias de estresse oxidativo. Em pacientes hipertensos, o aumento no consumo de soja se mostrou benéfico na redução de parâmetros pró-oxidantes, com consequente benefício clínico no controle da pressão arterial⁸⁸.

1.2.3. O papel da proteína Klotho

O gene *Klotho* foi identificado originalmente como supressor de efeitos da idade, com funções pleiotrópicas. A família de proteínas Klotho é composta por 3 diferentes membros: (1) α -Klotho, presente nos rins e nas paratireóides, responsável pela supressão da absorção renal de fosfato e síntese de vitamina D ativa, (2) β -Klotho, presente no fígado, capaz de interagir de forma endócrina na resposta à insulina, (3) γ -Klotho, presente em olhos, rins e gordura, com função ainda não completamente conhecida⁸⁹. Quando abordarmos a proteína Klotho ao longo deste trabalho, estaremos nos referindo à proteína α -Klotho expressa em rins, exceto se especificado de outra forma.

O Klotho é uma proteína trans-membrana de 135 quilodaltons (KDa) que é expressa principalmente em túbulos distais⁸⁹. O Klotho de membrana forma complexos com receptores de proteínas da família de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), aumentando suas afinidades seletivas ao FGF23, um hormônio fosfatúrico.

À sua descrição inicial⁹⁰, mostrou-se que a deficiência na expressão do gene *Klotho* levava os animais a um fenótipo de envelhecimento precoce muito importante, com restrição de crescimento, redução na sobrevida, rarefação de pêlos e aterosclerose avançada, além de maior susceptibilidade à injúria renal. Órgãos e tecidos de camundongos isentos de Klotho apresentam um número reduzido de células-tronco, com maior senescência de células progenitoras⁹¹. Curiosamente, a senescência em estados de déficit de Klotho pode ser revertida com a correção da hiperfosfatemia por ele induzida⁹⁰.

Klotho também já foi demonstrado como biomarcador precoce de IRA, sendo que a lesão de IR é associada à redução na expressão renal, urinária e plasmática da proteína Klotho. Mais do que um simples marcador, a administração exógena de Klotho é capaz de reverter parcialmente o dano renal induzido pela IR⁹².

A deficiência de Klotho já foi associada a estado de estresse oxidativo aumentado, tanto em modelos de doença renal quanto em pacientes submetidos a diálise crônica⁹³. O Klotho secretado está ativo na regulação de

situações de estresse oxidativo ⁹⁴, sendo capaz de induzir enzimas antioxidantes ⁹⁵.

Klotho inibe a expressão da proteína p21 ⁹⁶, inibidora do ciclo celular e indutora de estados de senescência, e inibe o TGF β , o mais potente indutor universal de fibrose renal ^{89; 97}.

Klotho pode, ainda, ter um papel importante na modulação da inflamação. Células endoteliais de veia umbilical humana respondem à incubação com TNF- α com o aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM)-1 e de moléculas de adesão da célula vascular (VCAM)-1, com a ativação da via inflamatória do fator de transcrição NF κ B, e com a inibição da fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A pré-incubação das células com Klotho previne todos esses efeitos pró-inflamatórios vasculares ⁹⁸. A adição de Klotho exógeno a células senescentes por replicação não modifica a proporção de células com telômeros curtos; entretanto, quando a senescência celular é associada ao estímulo com citocinas inflamatórias, como o TNF α , a adição de Klotho exógeno pode prevenir o encurtamento de telômeros ⁹⁹.

O déficit de Klotho está também relacionado a alterações na expressão de alguns microRNAs (miRs), estruturas capazes de interferir em diversas vias celulares, como mais especificado a seguir.

1.2.4. microRNAs e senescência

MicroRNAs são pequenos ácidos ribonucleicos (RNAs) de 19 a 24 nucleotídeos de extensão que não são codificadores, e estão envolvidos na regulação epigenética da expressão de proteínas. O genoma humano contém aproximadamente 1700 miRs, e estimativas sugerem que eles sejam capazes de regular entre 74% e 92% dos transcritos genéticos^{81; 100}. Cada miR pode ter múltiplos alvos de RNA mensageiro, assim como um único RNA mensageiro pode ser afetado por diversos miRs⁸¹.

Evidências têm demonstrado que os miRs estão contidos em exossomas, nos quais são transportados para fora da célula e captados por células vizinhas, funcionando de forma parácrina, ou entrando na circulação, agindo como hormônios em resposta sistêmica^{101; 102}.

Pacientes obesos apresentam maior concentração de fator de crescimento semelhante a insulina (IGF)-1 circulante que indivíduos normais, talvez em resposta ao estado de hiperinsulinemia crônica que apresentam^{103; 104}. O miR-34a é um dos miRs mais ativados em fígados de camundongos obesos¹⁰⁵, e sabe-se que ele é capaz de inibir a atividade de proteína Klotho, principalmente em sua forma β -Klotho¹⁰⁵. Sabe-se que β -Klotho é capaz de inibir as vias de insulina e IGF-1¹⁰⁶, e que a interrupção na via de sinalização composta por insulina e IGF-1 permite o aumento na expectativa de vida de animais como minhocas, moscas e roedores¹⁰⁷.

Dessa forma, é possível estabelecer uma ligação entre obesidade, elevação de miR-34a e inibição de Klotho, com consequente aumento de vias de indução de senescência celular.

Células endoteliais em senescência replicativa apresentam expressão elevada de miR-34a⁸¹, e outros miRs, como o miR-29a e miR-335 também já foram associados à modulação de resposta de senescência⁸¹. Bai e colaboradores demonstraram que miR-34a e miR-335 são capazes de promover um perfil senescente em células mesangiais renais jovens por inibição de enzimas anti-oxidantes, e que o tratamento com o anti-senso miR-335 e miR-34a é capaz de resgatar o fenótipo jovem em células idosas¹⁰⁸. Ao

miR-34a já foi atribuída influência sobre mecanismos de regulação mitocondrial para regulação de vias de estresse oxidativo ⁸¹.

O miR-34a também já se mostrou envolvido na regulação de funções como crescimento e proliferação, e está associado a algumas doenças relacionadas ao envelhecimento, como câncer e doenças metabólicas e cardiovasculares ⁸¹.

O miR-29a já foi demonstrado como possível ligante de TLR8, levando à ativação de vias pró-inflamatórias ¹⁰⁹. Além disso, miR-29a e miR-29b já foram demonstrados como superexpressos em camundongos deficientes em Klotho, sendo sugeridos como marcadores moleculares de senescência ¹¹⁰.

1.2.5. Proteínas relacionadas ao ciclo celular

O ciclo de vida de uma célula envolve duas fases: (1) a intérfase, fase em que a célula está em atividade funcional, e (2) mitose. A intérfase pode ser subdividida em fases G0, G1, S e G2.

Células em G0 estão quiescentes, sem estímulo para proliferação. Quando em G1, as células passam por processos de crescimento e diferenciação, com produção proteica de acordo com suas funções. A fase S corresponde à fase de síntese, em que a célula inicia o processo de duplicação de seu DNA em preparação para divisão celular futura, e a fase G2 se caracteriza pela checagem do DNA duplicado. Encerrada a fase G2, ocorre a divisão celular propriamente dita, a mitose.

A regulação do ciclo celular acontece em grande parte pelos complexos proteicos ciclina / quinase dependente de ciclina (CDK). O complexo ciclina D-CDK4 permite a fosforilação de retinoblastoma (Rb), liberando o fator de transcrição E2F para a produção de outras ciclinas e de DNA polimerase (figura 4). Tanto as ciclinas quanto o Rb fosforilado levam à ativação do ciclo celular.

Há duas famílias importantes de genes inibidores do ciclo celular: (1) a família CIP/KIP, que inclui os genes p21^{Cip1} (p21), p27^{Kip1} (p27), e p57^{Kip2} (p57), importantes para a regulação do crescimento celular, capazes de manter a célula na fase G1 por inibição de complexos proteicos do tipo ciclina-CDK; (2) a família INK4, que inclui os genes p15^{Ink4b} (p15), p16^{Ink4a} (p16), p18^{Ink4c} (p18) e p19^{Ink4d} (p19), relacionadas a processos de desenvolvimento e transformação celular, inibidores da ação da proteína CDK4 ¹¹¹.

Figura 4: Principais proteínas inibidoras do ciclo celular: o complexo ciclina D-CDK4 permite a fosforilação de Rb, liberando o fator de transcrição E2F para a produção de outras ciclinas e de DNA polimerase. Tanto as ciclinas quanto o Rb fosforilado levam à ativação do ciclo celular. Há proteínas inibidoras do ciclo celular, como p21, p27, p57, p15, p16, p18 e p19, que atuam mantendo a célula em fase G₁ e não permitindo sua progressão no ciclo celular. Adaptado de referência ¹¹¹.

A lesão de IR sabidamente leva ao aumento de p16, p21 e p27 renais, principalmente em compartimento túbulo-intersticial ¹¹². A regulação do ciclo celular acontece de forma tão importante na IRA, que fatores como a proteína ligadora de fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP)-7, indutora de p21, e a proteína inibidora tecidual das metaloproteinases (TIMP)-1, indutora de p27, já foram classificadas como ótimos biomarcadores de risco de IRA em pacientes críticos ¹¹³.

Proteínas como p16 e p21 são capazes de induzir senescência ¹¹⁴, e já se sabe que há indução dependente de p21 na expressão renal de β gal após a lesão de IR ¹¹⁵. O próprio envelhecimento é também capaz de levar ao aumento de proteínas inibidoras do ciclo celular, tanto em humanos como em ratos ¹¹⁶, o que é compatível com o conhecimento de que células senescentes param irreversivelmente na fase G1 do ciclo celular ¹¹⁷. A lesão de IR em rins idosos é ainda mais grave que em rins jovens ^{118; 119}, e isto também está associado ao aumento da expressão de proteínas p16 e p21 ¹²⁰.

Cerdá e colaboradores começaram a mostrar em 2008 que a IRA nem sempre é uma doença curável, pois em sua história natural grande parte dos pacientes evolui para perda progressiva de função renal e doença renal crônica futura ²⁵. Isto pode estar associado ao fato de a proteína p21 estar fortemente associada à produção de TGF β e à fibrose renal futura ¹²¹.

1.3. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco são aquelas com o potencial de se desenvolver em vários tipos diferentes de células no organismo. Em muitos tecidos elas fazem o reabastecimento das células que morrem, em um sistema de reparo interno, dividindo-se sem limite. Quando uma CT se divide, cada nova célula tem potencial tanto para se manter como CT quanto para se tornar um outro tipo de célula, com função mais especializada, como um miócito, um eritrócito ou uma célula tubular renal.

As CTs são distinguidas dos outros tipos de células por duas características importantes: (1) elas são células não especializadas, capazes de se renovar através da divisão celular, por vezes após longos períodos de inatividade; (2) sob certas condições fisiológicas ou experimentais, elas podem ser induzidas a se desenvolver em tecidos ou células de órgãos específicos, com funções especiais. Em alguns órgãos, como o intestino e a medula óssea, as CT se dividem regularmente para reparar e substituir as células desgastadas dos tecidos. Em outros órgãos, entretanto, como o pâncreas e o coração, as CT se dividem apenas em circunstâncias especiais.

Existem basicamente dois tipos principais de CT: (1) embrionárias (originadas a partir de embriões animais) e (2) não-embriônicas ("somáticas" ou "adultas") (figura 5), podendo pertencer a 3 linhagens principais: (1) endodérmica, (2) ectodérmica e (3) mesodérmica, com possível diferenciação para células-tronco mesenquimais (CTM) ou células-tronco hematopoiéticas (CTH) (figura 5). A partir do cordão umbilical podemos extrair os dois principais tipos de CT adultas: as CTM e as CTH ¹²².

Figura 5: Origens das células-tronco: as células-tronco embrionárias se originam a partir de embriões animais, e podem dar origem às células-tronco adultas. As células adultas podem pertencer à qualquer uma das três linhagens, sendo que é da linhagem mesodérmica que derivam as CTM e as CTH. Células totipotentes: podem gerar um novo organismo inteiro; células pluripotentes: podem gerar células dos três folhetos germinativos (adaptado de: <http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/07/stemcells2-GIF.gif>).

As CTM são fusiformes, morfológicamente semelhantes a fibroblastos, e se caracterizam pela habilidade em formar unidades formadoras de colônias *in vitro*. Essas células são negativas para marcadores de superfície hematopoiéticos, como CD3, CD14, CD45, CD34, CD133, HLA-DR, e são positivas para CD105, CD90, CD73 e CD44 ¹²³. Como não há um antígeno que seja expresso exclusivamente pelas CTM humanas, foram propostos três critérios para sua caracterização: (1) aderência a superfícies plásticas; (2) potencial de diferenciação em osteócitos, adipócitos e condrócitos; e (3) expressão de antígenos de superfície de células-tronco ¹²³. Dessa forma, quando colocadas em cultura sobre placa plástica, as células aderentes em geral formam a população de células mesenquimais.

Podemos obter CTM a partir de diversos tecidos, adultos ou não, como sangue de cordão umbilical, estroma de cordão umbilical (também conhecido como geléia de Wharton), líquido amniótico, medula óssea, músculos, tecido adiposo, omento ou ossos, por exemplo ^{124; 125}. Estas células não expressam antígenos ABO ou MHC de classe II, o que permite seu uso em indivíduos de qualquer tipo sanguíneo, sem necessidade de teste de compatibilidade imune ²⁹. Além disso, sabe-se que as CTM apresentam capacidade imunomoduladora, e são capazes de levar ao aumento da atividade de células T regulatórias e menor atividade inflamatória ^{123; 126}.

O uso das CTM ou seus derivados para tratamento de diversas doenças já foi testado com sucesso em diversos modelos experimentais ^{127 128 23 129}. Na IRA por IR, diversos são os estudos com bons resultados ^{23; 35; 130; 131; 132; 133}.

Diversos ensaios clínicos já estão em andamento com o uso desse tipo de células: há mais de 450 estudos registrados em www.clinicaltrials.gov utilizando terapia com CTM em diversas doenças, sendo que 30 destes estudos envolvem o uso de CTM em doenças renais. Alguns deles já foram publicados, e demonstraram segurança no uso de células autólogas, com benefício renal em situações de IR com ativação imune, como o transplante renal ^{134; 135; 136}.

1.3.1. Mecanismos de ação

Até meados dos anos 2000, alguns experimentos baseados em transplante de medula óssea indicavam que as CT derivadas de medula poderiam contribuir para a repopulação de néfrons doentes^{137; 138; 139} e CTM eram encontradas junto aos rins lesados quando injetadas em camundongos com IRA^{139; 140; 141; 142; 143}. Entretanto, vários relatos apontavam para um recrutamento transitório das CT na vasculatura renal, sem a incorporação direta das células nos túbulos em regeneração^{23; 130; 139; 144}.

Estudos da Universidade de Harvard^{6; 8} foram capazes de demonstrar que a reparação do epitélio tubular após lesão de IR acontecia por meio de células epiteliais diferenciadas que sobreviveram à lesão e proliferaram para repopular os túbulos. Dessa forma, as CT apenas dariam o suporte para que as células epiteliais intrínsecas renais fossem capazes de sobreviver à injúria^{139; 145; 146}.

Passou-se a demonstrar que a injeção de meio de cultura condicionado, mesmo sem células, poderia ter efeito benéfico semelhante ao tratamento com as CTM. O reconhecimento de fatores solúveis e microvesículas em meio de cultura após cultivo de células permitiu o entendimento possíveis mecanismos de ação das CTM, com ação parácrina mais importante que a ação de repopulação e diferenciação celular^{139; 147}.

O conteúdo das microvesículas passou a ser objeto de investigação, e descobriu-se que o tratamento com RNase impede a ação terapêutica das microvesículas^{139; 148; 149}, sugerindo efeitos biológicos dependentes de RNA, particularmente miRs^{139; 149}.

Microvesículas derivadas de CT embrionárias são capazes de reprogramar progenitores hematopoiéticos através de um mecanismo dependente de RNA mensageiro (RNAm)¹⁵⁰, e a transferência de RNAm também é o fator desencadeador do estímulo de angiogênese em células endoteliais humanas, a partir de microvesículas derivadas de células progenitoras endoteliais¹⁵¹.

A IRA pode levar ao aumento da expressão de proteínas envolvidas em biossíntese de miRs (como Dicer 1, Drosha e Argonaut 2), sendo que a injeção de CTM provenientes de tecido adiposo em animais leva à redução da expressão dessas proteínas^{148; 149}.

Em modelo de IR em ratos, a injeção de microvesículas derivadas de células progenitoras endoteliais humanas já se mostrou nefroprotetora, sendo que a transferência de miRs para as células renais residentes permitiu sua reprogramação, com aumento de angiogênese e redução de apoptose¹⁴⁹ (figura 6). Alguns miRs já foram associados a alterações no balanço oxidativo, sendo capazes de promover fenótipo de senescência nas células^{108; 152}.

Figura 6: Mecanismos de ação das células-tronco: a transferência de RNA (principalmente miRs) das CTs para os tecidos lesados permite a reprogramação das células residentes, e este parece ser um dos mecanismos de ação das CTM mais importantes reconhecidos atualmente. Adaptado de ref¹⁵³.

A melhora renal com o uso de CTM e microvesículas delas derivadas na IRA por IR em ratos já foi demonstrada em diversos estudos^{23; 35; 130; 131; 132; 133}, com diferentes vias de administração levando a bons resultados.

A aplicação de CTs localmente no tecido lesado tem a possível vantagem de permitir maior enxertia celular onde a ação benéfica deve

acontecer. Em doença renal crônica em ratos, CTM aplicadas na região subcapsular do rim remanescente leva a melhora importante em parâmetros de fibrose e cronicidade renal ¹²⁷. Da mesma forma, em transplante alogênico de aorta, CTM semeadas no lúmen do vaso enxertado foram capazes de reduzir achados de vasculopatia crônica do enxerto ¹²⁵. O transplante de CTs intramiocárdicas foi também efetivo em reduzir as consequências de lesão por infarto do miocárdio em ratos ¹⁵⁴. Assim, vê-se que a injeção de CT localmente pode ser um método eficaz de tratamento de lesão orgânica.

Entretanto, sabendo-se que a ação das CTM não depende tanto de sua enxertia no local de lesão, o uso sistêmico, seja por via endovenosa (EV) como por via intraperitoneal (IP), parece uma opção bastante atrativa. As CTs apresentam tropismo pelos órgãos lesados, e são capazes de promover um ambiente pró-sobrevivência celular no local de lesão, mesmo que injetadas sistemicamente ¹⁵⁵.

Diversos modelos de IRA já foram tratados com diferentes tipos de CTs, em diferentes tempos de avaliação, com administração de células por via sistêmica endovascular ^{1; 13; 23; 129; 140; 155; 156; 157; 158} apresentando boa resposta. Da mesma forma, a via IP já foi a opção terapêutica em diferentes trabalhos ^{126; 159; 160}, também com bons resultados. Sabe-se que quando a infusão acontece por via EV, grande parte das células fica presa à vasculatura pulmonar, porém isso não impede boa resposta terapêutica, mesmo que apenas uma pequena parte das células chegue ao local desejado de lesão (afinal, a ação é parácrina ou sistêmica) ¹²⁵.

Entretanto, o uso endovascular impõe limitação importante quanto ao número e diluição das células. O tratamento da IRA por IR com células induzidas pluripotentes por via arterial mostrou-se dependente do número de células utilizadas. Quando 5×10^5 células foram diluídas em 200μL de solução-tampão, o efeito benéfico da terapia celular se mostrou máximo, com maior efeito terapêutico quanto maior o número de células. Entretanto, quando quantidades maiores (5×10^6 ou 5×10^7 células) foram utilizadas, houve evidência de agravamento da lesão renal, com a presença de êmbolos celulares em pequenos vasos, afetando a circulação renal ¹⁶¹. Em outro estudo

¹⁶², utilizando CTM derivadas de tecido adiposo em lesão craniana, já havia aumento de mortalidade de animais que recebiam terapia por via EV com 4×10^5 células por 200 μ L de diluente, com coagulação intravascular notada à microscopia acometendo diversos órgãos, inclusive os rins. O limite de segurança imposto por esse trabalho foi de 2×10^5 células por 200 μ L de diluente, o equivalente a ao menos 1000 μ L para o uso de 1×10^6 células.

Assim, as CTM podem ser aplicadas sistemicamente para que sua ação seja exercida, e caso a via EV seja utilizada, deve haver preocupação quanto à concentração de células na solução aplicada, para evitar obstrução de microvasos pelos êmbolos celulares que podem se formar.

1.3.2. Células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano

Em 1989 o grupo do dr. Broxmeyer publicou a primeira experiência com coleta, criopreservação e análise de função de células hematopoiéticas provenientes de cordão umbilical humano ¹⁶³. Nesse mesmo ano, esse grupo também demonstrou o primeiro uso com sucesso de células hematopoiéticas do cordão umbilical de um neonato, aplicadas em seu irmão, submetido a quimioterapia mieloablativa para tratamento de anemia de Fanconi ¹⁶⁴. A essa ocasião já se percebia que as células provenientes de cordão umbilical eram menos reativas contra um pool de células alogênicas quando comparadas a células adultas de sangue periférico ¹⁶⁴. Dessa forma, essas células podem ser utilizadas em transplantes hematopoiéticos sem a necessidade de compatibilidade HLA completa, diferentemente do que acontece nos transplantes de células provenientes de medula óssea ¹⁶⁵, em que a compatibilidade HLA total é requerida.

Entretanto, apesar de atraentes por levarem a menor ativação inflamatória, as células de cordão apresentam uma quantidade pequena de célula-tronco. Para transplante de células hematopoiéticas em adultos, duas unidades de cordão umbilical devem ser utilizadas para cada receptor para que o número ideal de células recebidas seja atingido ¹⁶⁵. Dessa forma, o cultivo de tais células permite que uma quantidade maior seja obtida, o que torna seu uso clínico mais factível.

O sangue de mais de 500.000 unidades de cordão umbilical já foi doado para uso público para transplante de células hematopoiéticas alogênico, e mais de 25.000 transplantes de células de cordão umbilical já foram realizados em todo o mundo ¹⁶⁵.

A probabilidade de um indivíduo desenvolver uma doença tratável com as células progenitoras hematopoiéticas de seu próprio cordão umbilical varia entre 0,0005% e 0,04% nos primeiros 20 anos de vida ¹⁶⁶. O armazenamento para uso próprio é realizado por bancos particulares, sob custo financiado pela própria família, e não parece ser procedimento custo-efetivo. Dessa forma, a

doação para bancos de cordão públicos para transplantes hematopoiéticos alogênicos ou para protocolos de pesquisa se mostra uma alternativa viável e apropriada para a maior parte dos cordões umbilicais de bebês nascidos vivos e saudáveis, o que permite que a terapia com células-tronco derivadas de cordões umbilicais humanos possa ser uma realidade com poucas preocupações do ponto de vista ético no futuro.

A atividade imunomodulatória é parte do mecanismo de ação das CTM, e permite que a terapia inter-espécies seja uma realidade em modelos experimentais, com diversos estudos demonstrando benefício com o uso de células humanas e seus derivados como xenotransplantes em animais imunocompetentes ^{35; 149; 167; 168}.

Alguns estudos demonstram a presença de telômeros mais longos em células-tronco hematopoiéticas (CD34⁺CD38⁻) provenientes de cordão umbilical do que na mesma população de células em medula óssea adulta ^{66; 169} ou em sangue periférico ^{66; 170}. Além disso, a presença de telômeros maiores em sangue de cordão umbilical não se limita às CT, mas também pode ser observada em células hematopoiéticas maduras, incluindo células T, “natural killer” (NK) e granulócitos ^{66; 170}. CTM derivadas de cordão umbilical humano (chCTM), quando comparadas a CTM derivadas de medula óssea humana ou tecido adiposo, apresentam maior taxa de proliferação celular e clonalidade, com menor expressão de marcadores conhecidos de senescência, como p16 e p21 ¹⁷¹.

Sabe-se, ainda, que a infusão de células jovens de medula óssea em camundongos idosos leva a menor deposição de colágeno IV no mesângio e menor expressão renal dos marcadores de senescência β-galactosidase, p16 e p21 quando comparada à infusão de células idosas nesses mesmos camundongos. O gene anti-idade Klotho também tem sua expressão aumentada quando as células infundidas são mais jovens ¹⁷².

O uso de microvesículas oriundas de chCTM já foi testado em ratos com IRA por lesão de IR e por cisplatina, com melhora em parâmetros inflamatórios ³⁵ e de estresse oxidativo ¹⁶⁸ nos animais tratados. Pode-se esperar que as

chCTM, muito jovens, com longos telômeros e menor expressão de p16 e p21, possam ser particularmente interessantes para tratamento de IRA.

Há atualmente 57 estudos em andamento testando CTM derivadas de cordão umbilical humano para tratamento de diversas lesões orgânicas. Por enquanto, a única condição nefrológica já em teste em ensaios clínicos com chCTM é a nefrite lúpica, em estudo que está sendo realizado na China.

As chCTM derivadas de cordão umbilical humano podem ser obtidas a partir de sangue de cordão ou a partir de seu estroma, a geléia de Wharton. No entanto, o estroma do cordão é muito mais eficaz como fonte de CTM, com aproveitamento total das amostras em procedimentos de cultura celular, enquanto apenas 10% das amostras de sangue de cordão levam à geração de CTM¹⁷³.

Assim, os cordões umbilicais humanos são fonte eticamente viável para obtenção de CTM, e as células deles derivadas parecem ser particularmente interessantes no tratamento da IRA por IR. A geléia de Wharton, por apresentar melhor aproveitamento na técnica de extração, é uma alternativa melhor que o sangue do cordão umbilical para cultura celular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Demonstrar que a IRA causada por IR pode ser um protótipo de envelhecimento renal precoce e que as chCTM podem minimizar o fenótipo de senescência induzido pela IRA.

2.2. Objetivos específicos

Isolar CTM a partir de estroma de cordão umbilical humano;

Demonstrar que as chCTM podem amenizar a IRA induzida por IR em ratos;

Caracterizar os componentes de senescência replicativa e senescência induzida por estresse no modelo de IR;

Avaliar possíveis mecanismos de indução de senescência da IRA, como geração de estresse oxidativo, inflamação e ativação de miRs;

Avaliar quais mecanismos de senescência induzida por IRA podem estar reduzidos por ação das chCTM.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Considerações gerais - a escolha do melhor modelo

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética do Hospital Universitário (HU-USP) (1278/13), pela Comissão Interna para Avaliação de Projetos de Pesquisa (CIAPP) da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (276/10) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina na Universidade de São Paulo, que inclui aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP) (0003/11).

Para os experimentos foram utilizados ratos Wistar-Kyoto (WKY) (*Rattus norvegicus* de linhagem domesticada e singênica) de 2 a 3 meses de idade, pesando de 200 a 300g, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram abrigados em ambiente com ciclo claro/escuro a cada 12h, com quantidade suficiente de água limpa e ração. Os animais foram testados quanto à uréia plasmática antes dos procedimentos, e todos apresentavam valor de uréia menor que 60 mg/dL. Todos os procedimentos foram feitos de acordo com as indicações do Comitê de Ética Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os animais foram submetidos ao modelo de isquemia renal com clampeamento de artérias renais bilateralmente e reperfusão subsequente. Para decisão quanto ao tempo de isquemia a ser utilizado e à via de infusão das células, foram realizados 3 experimentos de curva de uréia. Para todas as curvas foram utilizados os mesmos 4 ratos controles (C).

A primeira curva de uréia foi realizada com isquemia arterial renal bilateral por 30 minutos, com reperfusão após. Após 6 horas do início da reperfusão, 4 animais receberam 1×10^6 chCTM diluídas em 0,5mL de solução

fisiológica por via EV, e 4 animais receberam apenas 0,5mL de solução fisiológica. Foi dosada a uréia plasmática de todos os animais diariamente por 6 dias, e notou-se que a lesão induzida foi insuficiente para gerar IRA significativa (mais detalhes são dados na seção “Resultados”).

Dessa forma, realizou-se a segunda curva de uréia, em que isquemia arterial renal bilateral foi realizada por 45 minutos, com reperfusão após. Após 6 horas do início da reperfusão, 5 animais receberam 1×10^6 chCTM diluídas em 0,5mL de solução fisiológica por via EV, e 4 animais receberam apenas 0,5mL de solução fisiológica. Foi dosada a uréia plasmática de todos os animais diariamente por 6 dias, e notou-se que a lesão induzida foi bastante grave e levou à IRA, porém os resultados obtidos foram contraditórios à literatura, com piora de função renal com o uso de chCTM após lesão de IR. Um animal do grupo que não recebeu chCTM e dois animais do grupo que recebeu chCTM morreram nas primeiras 24 horas, e seus dados foram analisados apenas por esse período. Maiores informações podem ser encontradas na seção “Resultados”.

Sabe-se que o uso endovascular de CTM impõe limitação importante quanto ao número e diluição das células, pois células muito concentradas podem levar ao agravamento da lesão renal, com a presença de êmbolos celulares em pequenos vasos^{161; 162}. Este foi o motivo atribuído à piora renal após o uso de chCTM à aplicação EV.

Grande parte dos estudos que demonstraram melhora renal com o uso de CTM utilizou ao menos 1×10^6 células por animal^{1; 13; 23; 126; 156; 160}, e por isso essa foi a quantidade de células escolhida para o tratamento em nosso estudo. A solução seria a diluição das 1×10^6 células em cerca de 1mL de soro fisiológico, o que tornaria a via intravascular inviável, pois este é um alto volume, difícil tecnicamente de ser aplicado em veia caudal.

Por conta disto, e por haver diversas evidências da aplicação IP como boa alternativa para a terapia celular^{126; 159; 160}, optamos por utilizar 1×10^6 chCTM diluídas em 2mL de solução fisiológica, com aplicação IP após 6h da indução da IRA por IR.

Dessa forma, delineou-se o terceiro e último experimento de curva de uréia, em que isquemia arterial renal bilateral foi realizada por 45 minutos, com reperfusão após. Após 6 horas do início da reperfusão, 5 animais receberam 1×10^6 chCTM diluídas em 2mL de solução fisiológica por via IP, e 5 animais receberam apenas solução fisiológica. Foram analisados também nesta curva os animais submetidos à IR por 45 minutos sem tratamento celular da segunda curva de uréia, o que permitiu a análise de 9 animais do grupo isquêmico sem tratamento.

Foram dosadas uréia e creatinina plasmáticas de todos os animais diariamente por 7 dias. No segundo e no sétimo dia foi dosado também o sódio plasmático. Além disso, os animais foram colocados em gaiola metabólica 2 vezes nesse período, no primeiro e sexto dias após a indução da IR, para coleta de urina de 24h e dosagem de sódio e creatinina urinários. Dessa forma, obteve-se também material necessário para a medida de fração de excreção de sódio (FENa) e depuração de creatinina no segundo (D2) e no sétimo (D7) dias após a indução da lesão de isquemia-reperfusão renal.

Esta curva se demonstrou adequada, e com base nela o protocolo foi delineado. Dessa forma, o modelo de isquemia e reperfusão estudado foi o de clampeamento das artérias renais bilateralmente com reperfusão após 45 minutos, com aplicação de 1×10^6 chCTM diluídas em 2mL de solução fisiológica ou de apenas 2mL de solução fisiológica, a depender do grupo analisado, por via IP.

Observou-se que o pico de lesão renal acontecia no segundo dia após a lesão de IR, e este foi, portanto, o tempo utilizado para a eutanásia de parte dos animais ($n=11$; $n=5$ para animais submetidos à IR sem tratamento e $n=6$ para animais submetidos à IR com tratamento com chCTM) para coleta de sangue e rins. Observou-se, ainda, que em 7 dias havia recuperação de lesão em todos os grupos, e este foi o momento escolhido para a eutanásia de outra parte dos animais ($n=11$; $n=5$ para animais submetidos à IR sem tratamento e $n=6$ para animais submetidos à IR com tratamento com chCTM), também para coleta de sangue e órgãos.

3.2. Desenho do estudo

Foram utilizados cordões umbilicais humanos obtidos de forma estéril a partir de puérperas saudáveis e voluntárias, após assinatura de termo de consentimento livre e informado. A extração do estroma da geléia de Wharton foi realizada em até 24 horas após a coleta do cordão.

Os vasos do cordão foram retirados, e o estroma isolado foi cortado em pequenos pedaços denominados explantes. Os explantes foram cultivados até que houvesse extração de chCTM (protocolo descrito detalhadamente a seguir), utilizadas para injeção nos animais entre a terceira e a quinta passagens em cultura. Realizou-se imunofenotipagem de amostras de células para sua melhor caracterização, além de ensaios de diferenciação policlonal.

Ratos WKY foram submetidos a cirurgia para isquemia arterial renal bilateral por 45 minutos, com reperfusão após. Foram realizados experimentos em 5 grupos diferentes de animais (o número de animais entre parênteses se refere aos animais utilizados no experimentos após as curvas de uréia. Os dados coletados dos animais da curva de uréia foram analisados em conjunto, quando possível):

- (1) Controles normais (C): ratos controle, sem intervenção (n=6);
- (2) Isquemia e reperfusão com eutanásia após 2 dias da lesão (IR2): ratos submetidos ao modelo de IR sem tratamento celular, com eutanásia e coleta de sangue e rins após 2 dias da lesão (n=5);
- (3) Isquemia e reperfusão com infusão de chCTM com eutanásia após 2 dias da lesão (CTM2): ratos submetidos ao modelo de IR e tratados com 1×10^6 chCTM diluídas em 2mL de soro fisiológico após 6h da cirurgia, com infusão IP, com eutanásia e coleta de sangue e rins após 2 dias da lesão (n=6);
- (4) Isquemia e reperfusão com eutanásia após 7 dias da lesão (IR7): ratos submetidos ao modelo de IR sem tratamento celular, com eutanásia e coleta de sangue e rins após 7 dias da lesão (n=5);
- (5) Isquemia e reperfusão com infusão de chCTM com eutanásia após 7 dias da lesão (CTM7): ratos submetidos ao modelo de IR e tratados com 1×10^6 chCTM diluídas em 2mL de soro fisiológico após 6h da cirurgia, com infusão IP, com eutanásia e coleta de sangue e rins após 7 dias da lesão (n=6);

10⁶ chCTM diluídas em 2mL de soro fisiológico após 6h da cirurgia, com infusão IP, com eutanásia e coleta de sangue e rins após 7 dias da lesão (n=6).

No dia seguinte ao da indução da isquemia, todos os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais para coleta de urina de 24h, sendo que após esse período foi colhido sangue de todos os animais. Alguns animais (IR2 e CTM2) foram eutanasiados à esta ocasião, com retirada de rins para análises posteriores. Os animais dos grupos IR7 e CTM7 permaneceram vivos sem novos procedimentos até o sétimo dia após a IR, quando foram eutanasiados para coleta de rins e sangue. Parte dos rins foi armazenada em soluções conservantes de methacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial) ou formalina tamponada, para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica. A outra parte dos rins foi armazenada em nitrogênio líquido imediatamente, com posterior transferência para ultrafreezer a -80°C, para ser utilizada posteriormente para a extração de proteínas totais, proteínas de membrana, DNA e RNA.

Os rins conservados em soluções de methacarn e formalina foram retirados das soluções, e colocados em etanol 70% após 24h. Posteriormente foram emblocados em parafina, com a realização de cortes histológicos em branco (para imuno-histoquímica) e cortes corados com ácido periódico-Schiff (PAS).

Os rins armazenados a -80°C foram processados para separação e quantificação de proteínas totais e de membrana, para uso em Western blot e no ensaio de atividade intrínseca de telomerase; de DNA, para uso em Southern blot; e de RNA, para reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).

A figura 7 esquematiza o protocolo em linhas gerais.

Modelo geral

IR2 e CTM2

IR7 e CTM7

Figura 7: Delineamento geral do protocolo de pesquisa: excluindo-se os animais controle, todos os outros ratos foram submetidos à isquemia arterial renal bilateral por 45 minutos, com reperusão após. Os animais tratados receberam a infusão intraperitoneal de 1×10^6 chCTM diluídas em 2mL de salina após 6 horas da indução da lesão. Todos os grupos submetidos à IR foram colocados em gaiola metabólica entre o primeiro e o segundo dia após a indução da lesão, para coleta de urina de 24h em D2. Os animais dos grupos IR2 e CTM foram eutanasiados em D2, com coleta de plasma (para bioquímica) e tecido renal (para Western blot, histologia, imuno-histoquímica, Southern blot, ensaio de atividade de telomerase e qPCR). Os animais dos grupos IR7 e CTM7 tiveram apenas sangue e urina de 24h coletados em D2 (para bioquímica), e foram eutanasiados apenas em D7, quando foram coletadas amostras de sangue (para bioquímica) e tecido renal (para Western blot, histologia, imuno-histoquímica, Southern blot e ensaio de atividade de telomerase). WB: Western blot (imuno eletroforese de proteína); SB: Southern blot (imuno eletroforese de DNA).

A seguir há a descrição de cada um dos procedimentos de forma mais detalhada.

3.3. Modelo animal de isquemia e reperfusão

Para as cirurgias de indução de isquemia renal os ratos foram anestesiados (figura 8A) inicialmente com quetamina 70mg/Kg e xilazina 7mg/Kg IP, com suplementação caso necessário.

Após anestesia, os animais foram submetidos a tricotomia e a incisão mediana abdominal (figura 8B), com exposição dos pedículos e das artérias renais (figura 8C). Para não lesar as artérias renais e permitir reperfusão posterior de forma fácil, passou-se um fio de algodão sob cada uma das artérias renais (figura 8D), com a colocação de um pequeno tubo plástico (catéter de nylon) ao redor das extremidades dos fios, com posterior colocação de outro catéter de forma perpendicular (figura 8E). O fio foi amarrado (figura 8F), e dessa forma os rins ficaram isquêmicos. O mesmo procedimento foi feito inicialmente no rim direito, sendo após repetido no rim esquerdo de cada animal. Após a ligadura arterial em cada lado, iniciou-se a contagem do tempo de isquemia.

Após, os animais tiveram suas paredes abdominais provisoriamente suturadas em plano único (figura 8G) e foram colocados em repouso (figura 8H) até que se completassem quase 45 minutos de isquemia (figura 8I). Se necessário, após esse tempo os animais recebiam nova dose de anestesia.

A sutura abdominal foi retirada e o rim direito foi exposto (figura 8J). Ao final de 45 minutos a amarração foi cortada e a reperfusão se iniciou, com confirmação visual (figura 8K). O mesmo aconteceu à esquerda (figuras 8L e 8M). Ao final, 4mL de salina aquecida foram injetados na cavidade para reduzir a presença de ar intra-abdominal e a sutura final da parede abdominal, em 2 planos, foi realizada (figura 8N). Durante todo o procedimento os animais foram controlados para que suas temperaturas retais se mantivessem entre 35,0 e 36,5°C.

Figura 8: Modelo animal de isquemia e reperfusão renal: (A) anestesia dos animais via IP; (B) incisão mediana abdominal; (C) exposição da artéria renal esquerda; (D) passagem de fio para início de isquemia; (E) representação gráfica da passagem do fio de algodão pela artéria renal e colocação de um pequeno tubo plástico (catéter de nylon) ao redor das extremidades dos fios, com posterior colocação de outro catéter de forma perpendicular, para início da isquemia; (F) início de isquemia de rim esquerdo; (G) parede abdominal suturada; (H) repouso até que quase se completem os 45 minutos de isquemia (I) ilustração para representar a espera do tempo de isquemia; (J) aspecto do rim direito ao final da isquemia; (K) início da reperfusão do rim direito; (L) aspecto do rim esquerdo ao final da isquemia ; (M) início da reperfusão do rim esquerdo; (N) sutura em dois planos e término no procedimento cirúrgico.

3.4. Isolamento e caracterização das células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano

Foram utilizados cordões umbilicais humanos, obtidos de puérperas saudáveis voluntárias, após sua orientação quanto aos propósitos do protocolo e assinatura de consentimento informado. Foram coletados cordões umbilicais de forma estéril, com retirada do sangue de seu interior assim que eram coletados. Os cordões foram armazenados em meio de transporte (tampão fosfato-salino (PBS), penicilina 300U/mL, estreptomicina 300 µg/mL e heparina 25U/mL) em gelo até o laboratório (figura 9A), onde houve processamento do material para a extração de seu estroma, a geléia de Wharton, em até 24 horas após a coleta do cordão.

Todo o processamento dos cordões foi realizado com material cirúrgico autoclavado, em fluxo laminar situado em sala de cultura limpa. Os cordões foram lavados diversas vezes com PBS para remoção de possíveis resíduos de sangue, e cortados (figura 9B) em pedaços de cerca de 2 cm de comprimento para facilitar a manipulação cirúrgica em placas de Petri (figura 9C). Em cada pedaço de 2 cm foi feita incisão longitudinal, com dissecção dos vasos para sua retirada, para obter apenas o conteúdo do estroma dos cordões (figura 9D). As porções de estroma reservadas foram novamente cortadas, desta vez em pedaços de 1 a 5 mm, chamados de explantes (figura 9E), com aplicação cuidadosa sobre placas de cultura em plástico aderente de 6 poços (Corning, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (figuras 9F e 9G). Os explantes não foram tratados com collagenase como grande parte dos protocolos^{173; 174; 175}, pois nossa experiência com o uso da collagenase foi de insucesso na proliferação de células. Alguns autores demonstraram que é possível o isolamento de chCTM sem o uso de collagenase^{35; 176}, tornando apenas a obtenção de células um pouco mais demorada.

Após cerca de 20 a 30 minutos, os explantes secavam e aderiam às placas. Neste momento, cerca de 3 a 4 mL de meio de cultura completo (detalhado abaixo) foi acrescentado às placas com explantes, e as placas foram armazenadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 15 a 20 dias, sem

troca de meio, com observação dos explantes em placa em microscópio invertido cerca de 2 a 3 vezes por semana (figura 9H).

O meio completo utilizado era composto por meio α -MEM com glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com bicarbonato para pH 7,3; por 20% de soro fetal bovino (SFB) com inativação do complemento por calor (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e por antibióticos (penicilina 300U/mL, estreptomicina 300 μ g/mL, Life Technologies, Waltham, EUA).

Após 15 a 20 dias, em geral, havia início de migração de células do explante para a placa (figura 9I), e colônias de células começavam a se formar nas adjacências dos explantes (figura 9J). Essas células, fusiformes e aderentes à placa, já eram as chCTM iniciando processo de proliferação (figura 9K). A partir de então, passou-se a trocar o meio de cultura das placas de 2 a 3 vezes por semana, até que as células atingissem cerca de 80% de confluência (figura 9L).

À confluência, os explantes foram retirados e desprezados, e as células aderidas foram tratadas com cerca de 1mL de tripsina 0,25% (Life Technologies, Waltham, EUA) por poço, e colocadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 5 minutos. Após esse tempo, observava-se o desprendimento celular ao microscópio invertido – no caso de ainda haver células aderidas, elas eram cuidadosamente removidas mecanicamente com o uso de instrumento específico para essa finalidade (figura 9M). Quando praticamente todas as células se desprendiam da placa (figura 9N), o meio de cultura com as células soltas era passado para tubos cônicos de 15mL de capacidade (Corning, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), com centrifugação a 500xg por 10 minutos a 20°C. As células se depositavam no fundo dos tubos (figura 9O), e o meio era aspirado e desprezado.

As células eram ressuspensas em 1mL de meio de cultura completo para contagem em câmara de Neubauer (figura 9P), e depois mais meio era acrescentado para que elas fossem replaqueadas. O replaqueamento em geral foi feito com o uso de 1 a 10 X 10⁴ células por mm² de placa, e a escolha entre o replaqueamento em placas de 6 poços, garrafas de 25cm² ou garrafas de

75cm² variou de acordo com a quantidade de células que se obtinha ao final de cada tripsinização. Cada procedimento de tripsinização foi considerado uma passagem (P). Assim, células originadas do explante, em P0, após tripsinizadas passavam a ser células de primeira passagem, em P1. Células entre a terceira e a quinta passagem foram utilizadas como tratamento no animais submetidos à IR.

Quando a tripsinização era feita para permitir a aplicação IP nos animais, ao invés de ressuspensão em meio de cultura, as células eram suspendidas em 1mL de solução fisiológica. Após contagem, eram diluídas em maior volume para permitir a concentração de 1×10^6 células para cada 2mL.

Figura 9: Extração de células-tronco mesenquimais a partir da geléia de Wharton de cordão umbilical humano: (A) cordão umbilical humano em frasco contendo meio de transporte, recém-trazido ao laboratório, em fluxo laminar; (B) cordão umbilical sendo cortado para facilitar manipulação cirúrgica; (C) porções de cerca de 2 cm de cordão umbilical foram produzidas para facilitar a extração cirúrgica da geléia de Wharton; (D) porção extraída da geléia de

Wharton; (E) geléia de Wharton cortada em pequenos pedaços de 1 a 5 mm, chamados explantes; (F) aplicação dos explantes nas placas de cultura plásticas; (G) explantes aplicados, secando para melhor aderência à placa; (H) avaliação em microscópio invertido para observar se já há células migrando a partir do explante; (I) células-tronco mesenquimais em migração a partir do explante; (J) colônias de células-tronco mesenquimais na adjacência do explante; (K) células-tronco mesenquimais em proliferação, ainda com alguma contaminação por hemácias (células arredondadas não aderentes, eliminadas a cada troca de meio); (L) células-tronco mesenquimais confluentes; (M) remoção mecânica das células aderentes à placa após incubação com tripsina; (N) células soltas da placa de cultura após incubação com tripsina e remoção mecânica; (O) células acumuladas no fundo de tubo cônico após centrifugação; (P) câmara de Neubauer com células para contagem; (Q) aplicação intraperitoneal de células nos ratos. CTM: células-tronco mesenquimais.

Nas situações em que havia chCTM em grande quantidade e não havia perspectiva de uso próximo, as células foram tripsinizadas e congeladas, para posteriormente serem re-cultivadas em placas de cultura em uma passagem acima daquela prévia à tripsinização. O congelamento foi feito com solução de preservação contendo SFB 90% e dimetilsulfóxido (DMSO) 10% como criopreservante, com congelamento gradual, a -1°C por minuto, até -80°C . Para isso utilizamos o equipamento Mr.Frosty® (Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), que quando preenchido com álcool isopropílico e colocado em ultrafreezer reduz a temperatura lentamente até atingir -80°C (figura 10).

Figura 10: Mr.Frosty®, equipamento para congelamento celular programado: permite congelamento gradual a -1°C por minuto

(http://www.nalgenelabware.com/products/productDetail.asp?product_id=405#).

Após cerca de 80-90 minutos, as alíquotas com células eram transferidas para a fase líquida do nitrogênio, a -196°C , e armazenadas lá até que seu novo uso fosse necessário. O descongelamento foi feito sempre de forma rápida, em banho-maria a 37°C .

Após descongelamento, as células eram centrifugadas a $500\times g$ por 10 minutos a 20°C para que o meio contendo DMSO pudesse ser retirado, com ressuspensão das células em meio de cultura completo. As células eram, então, contadas e re-plaqueadas.

3.4.1. Imunofenotipagem

A imunofenotipagem de superfície de células de terceira a quinta passagem foi determinada pela técnica de citometria de fluxo. Nela, as células foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos com os anticorpos para marcação das moléculas de superfície CD3, CD45, CD34, antígeno leucocitário humano (HLA)-DR, CD105, CD73 e CD90, conjugadas com alofococianina (APC) ou ficoeritrina (PE) (BD Biosciences Research, Franklin Lakes, EUA).

Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com solução tampão e analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences Research, Franklin Lakes, EUA), com análise pelo programa BD CellQuest Pro[®]. As amostras foram classificadas de forma qualitativa, de acordo com a porcentagem de positividade da população.

3.4.2. Ensaios de diferenciação

Os ensaios de diferenciação celular foram feitos a partir de chCTM de segunda passagem, semeadas em placas de 6 poços, a 1×10^5 células por poço. Cada 2 poços foram reservados para uma das 3 linhagens de diferenciação: (1) adipogênica, (2) condrogênica e (3) osteogênica. Ao invés de meio de cultura completo, foram acrescentados os meios de indução próprios para cada diferenciação:

- para diferenciação adipogênica: meio basal de diferenciação de adipócito STEMPRO® com suplemento para adipogênese STEMPRO® (Life Technologies, Waltham, EUA), além de gentamicina a 10 mg/mL (Life Technologies, Waltham, EUA);
- para diferenciação condrogênica: meio basal de diferenciação de condrócito STEMPRO® com suplemento para condrogênese STEMPRO® (Life Technologies, Waltham, EUA), além de gentamicina a 10 mg/mL (Life Technologies, Waltham, EUA);
- para diferenciação osteogênica: meio basal de diferenciação de osteócito STEMPRO® com suplemento para osteogênese STEMPRO® (Life Technologies, Waltham, EUA), além de gentamicina a 10 mg/mL (Life Technologies, Waltham, EUA).

Os meios de diferenciação foram trocados 2 a 3 vezes por semana, e as células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂. As induções adipogênica e condrogênica foram realizadas por 14 dias, enquanto a indução osteogênica foi realizada por 21 dias. Após a indução completa, a diferenciação foi confirmada por meio de colorações específicas:

- coloração Oil-red para confirmar a transformação adipogênica pela visualização do acúmulo de vacúolos lipídicos citoplasmáticos
- coloração Alcian blue para confirmar a diferenciação condrogênica pela visualização de polissacarídeos sulfatados
- coloração vermelho de alizarina para confirmar a diferenciação osteogênica pela visualização de sais de cálcio

3.5. Aplicação das células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano

Os grupos de ratos IR2, IR7, CTM2 e CTM7 foram submetidos às cirurgias de IR, mas apenas os grupos CTM2 e CTM7 receberam tratamento celular.

O tratamento consistiu na aplicação de 1×10^6 chCTM frescas, recém-tripsinizadas, entre a terceira e a quinta passagens, diluídas em 2mL de solução fisiológica, via IP. As chCTM foram aplicadas nos animais após cerca de 6 horas do procedimento de IR.

3.6. Função renal e tubular

3.6.1. Parâmetros clínicos e bioquímicos

A função renal foi avaliada de duas formas: (1) avaliação da filtração glomerular, por meio da aferição da depuração de creatinina de 24h e da dosagem de uréia e creatinina plasmáticas; (2) avaliação da função tubular, por meio da análise de volume de diurese, osmolalidade urinária e FENa.

A medida da depuração de creatinina foi realizada entre o primeiro e o segundo dias após a indução da lesão de IR nos animais dos grupos IR2, IR7, CTM2 e CTM7. Os animais do grupo controle tiveram a depuração de creatinina realizada no mesmo dia da realização de outros animais de outros grupos. Após 24h da indução da isquemia, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais para coleta de urina, sendo que após 24h do início da coleta de urina (e após 48h da indução da isquemia) foi coletado sangue de todos eles para dosagem de creatinina, uréia e sódio plasmáticos. A urina coletada foi avaliada quanto ao volume total, e nela foram analisados creatinina e sódio, além de osmolalidade.

A creatinina foi dosada por meio de método colorimétrico, a uréia por método cinético automatizado e o sódio por eletrodo íon-seletivo. A osmolalidade foi aferida em aparelho Advanced Instruments Osmometer, modelo 3W2 wide range.

A depuração de creatinina foi calculada a partir das dosagens plasmática e urinária de creatinina, além do volume de urina de 24h. A fórmula que segue demonstra o cálculo realizado:

Depuração de creatinina = $(U_{Cr} \times V_u) / P_{Cr}$, onde:

U_{Cr} = concentração urinária de creatinina em mg/dL

V_u = volume urinário em mL/min

P_{Cr} = concentração plasmática de creatinina em mg/dL

A depuração de creatinina foi expressa corrigindo-se por 100 g de peso corpóreo, ou seja:

Depuração de creatinina corrigida = $\text{ml/min} / 100\text{g de peso corpóreo}$

A avaliação do volume de diurese também foi corrigida pelo peso corpóreo do animal, sendo calculado como $\text{ml/min}/100\text{g de peso corpóreo}$.

Para o cálculo de FENa, a fórmula a seguir foi utilizada:

$FENa = (U_{Na} / P_{Na}) / (U_{Cr} / P_{Cr})$, onde:

U_{Na} = concentração urinária de sódio em mEq/L

P_{Na} = concentração plasmática de sódio em mEq/L

U_{Cr} = concentração urinária de creatinina em mg/dL

P_{Cr} = concentração plasmática de creatinina em mg/dL

3.6.2. Avaliação histológica de lesão tubular

À ocasião da eutanásia, os animais foram perfundidos a pressão controlada e fluxo contínuo via artéria aorta com tampão PBS. Após clareamento dos órgãos, foram retirados os rins dos animais e armazenados conforme descrição prévia. As amostras fixadas em methacarn e formalina foram emblocadas em parafina e submetidas a cortes histológicos de 4µm de espessura.

Para avaliação do escore de lesão tubular as lâminas analisadas foram coradas com PAS e avaliadas em microscópio de luz à magnificação de 100X por médica patologista com experiência em análises renais (DMACM). A estratificação do grau de lesão foi dada pela porcentagem de túbulos que apresentavam edema celular epitelial, degeneração vacuolar, necrose ou descamação, como segue: <10%; 10-25%; 26-50% e > 50%. Todos os campos de cada lâmina foram analisados.

3.7. Estudo de imuno-histoquímica de infiltração leucocitária e proliferação em tecido renal

Foram utilizadas lâminas de rins coletados após perfusão com tampão PBS, fixados em methacarn e em formalina, emblocados em parafina e submetidos a cortes de 4µm de espessura.

Para as reações de imuno-histoquímica, as lâminas em branco foram desparafinizadas e hidratadas por imersão em xilol e em etanol em sequências de diluições progressivas (100%, 95% e 75%). A seguir, as lâminas foram incubadas em panela de pressão em tampão citrato 0,01M com pH 6,0, a pouco mais de 100°C, para recuperação antigênica.

A revelação utilizada em nossos protocolos utilizou a 3,3'-diaminobenzidina (DAB), que é cromógeno quando associado a peróxido de hidrogênio, e reage com o complexo avidina-biotina-peroxidase para a geração de coloração acastanhada (figura 11). Por conta disto, fez-se necessário o bloqueio da peroxidase endógena das células do corte histológico após a recuperação antigênica, para evitar falso-positivo.

Figura 11: Reação de imuno-histoquímica: a proteína de interesse se liga ao anticorpo primário, produzido em camundongo. O anticorpo secundário é uma imunoglobulina anti-camundongo, marcada por molécula de biotina. Uma molécula de avidina se liga a várias moléculas de biotina, e as biotinas do complexo avidina-biotina-peroxidase acrescentado são ligadas à enzima peroxidase. O complexo acrescentado se liga à biotina do anticorpo secundário. Quando se associam DAB e peróxido de hidrogênio, há reação com a peroxidase e a coloração acastanhada é gerada.

O bloqueio da peroxidase endógena se fez em solução de azida e peróxido de hidrogênio. Após lavagem em tampão PBS, os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos primários por toda a noite, a 4°C.

Os anticorpos primários foram diluídos em solução com albumina sérica bovina 1%, para reduzir marcações inespecíficas. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários:

- CD68 (Serotec, Hercules, EUA), em diluição 1:100, para a marcação de macrófagos;
- CD3 (Dako, Dinamarca), em diluição 1:50, para a marcação de linfócitos;
- PCNA (Dako, Dinamarca), em diluição 1:200, para a marcação de antígeno nuclear de células em proliferação.

Os três anticorpos primários utilizados foram produzidos em camundongo, então o anticorpo secundário utilizado para todos eles foi a imunoglobulina-G-anti-camundongo biotinilado, em diluição 1:200, também em solução albuminada. A incubação com o anticorpo secundário foi feita por 30 minutos a temperatura ambiente.

Após as incubações com os anticorpos e algumas lavagens com tampão PBS para a remoção de possíveis resíduos, os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina-enzima, que no caso foi a peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, EUA), também por 30 minutos a temperatura ambiente.

Novamente lavadas em tampão PBS, as lâminas foram, então, incubadas em solução contendo DAB e peróxido de hidrogênio, diluídos em tampão tris-hidroximetil-aminometano hidróclorido (Tris-HCl), por cerca de 10 minutos, a 37°C, para revelação da cor.

Foi realizada contra-coloração com hematoxilina, e os cortes passaram por incubação com etanol em concentrações progressivas (95% e 100%) e xilol. Após a montagem com as lamínulas, os cortes foram examinados sob microscopia de luz em campos de 0,087mm². Trinta campos sequenciais de cada corte foram avaliados, com cálculo das médias de células positivas em

região de transição córtico-medular renal. À magnificação estudada, a média representa a quantidade de células por área de $0,087\text{mm}^2$.

3.8. Preparo para técnicas mais avançadas

3.8.1. Técnica de extração de proteínas totais e de membrana do tecido renal

Parte dos rins que foram armazenados a -80°C foi utilizada para a extração de proteínas renais no protocolo que será descrito a seguir.

Após retirada do ultrafreezer, alíquotas ainda congeladas dos rins foram homogeneizadas em solução de K-HEPES (Manitol 200mmol/L, HEPES 80mmol/L, KOH 41mmol/L; pH 7,5) contendo inibidor de proteases (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA). O homogenato foi centrifugado a 500 X g por 30 minutos a 4°C . O sobrenadante compõe o extrato de proteínas totais, e foi utilizado de forma direta em alguns protocolos. O resíduo, composto por restos celulares e debris, foi desprezado.

Para a extração de proteínas de membrana, o extrato de proteínas totais foi utilizado, com centrifugação de parte do sobrenadante obtido à primeira centrifugação a 100.000 X g por uma hora a 4°C . O sobrenadante consiste na fração citoplasmática de proteínas, e foi desprezado. O “pellet” obtido constitui a fração de proteínas de membranas, e foi ressuspenso em K-HEPES para posterior uso em estudos de imunoeletroforese de proteínas.

A concentração das proteínas foi medida por meio de espectrofotômetro, utilizando o método de Bradford (Bioagency, Hamburgo, Alemanha).

3.8.2. Técnica de extração de DNA do tecido renal

Rins congelados a -80°C foram utilizados em menos de 24h de sua remoção para a extração de DNA genômico. Em procedimento prévio houve extração de DNA a partir de rins que estavam há cerca de 2 a 3 meses em ultrafreezer, porém houve degradação de parte do material. Para evitar a ação de possíveis Dnases renais, repetimos o protocolo com novo material, congelado em nitrogênio líquido imediatamente à extração, e armazenado a -80°C por menos de 24h até o início do procedimento de extração do DNA.

Foi utilizado kit comercial para a extração do DNA genômico (“QIAamp[®] DNA mini kit”, Qiagen, Venlo, Holanda) de acordo com o protocolo orientado pela empresa. Neste protocolo, a extração se baseia na purificação de ácido nucléico por ligação a membrana de sílica.

Nele, 20 a 25 gramas de tecido renal congelado foram triturados em placa sobre gelo, colocados em tubo plástico contendo proteinase K, e incubados a 56°C em homogenização por uma hora, para digestão.

Após, soluções tampão provenientes do kit estabilizam os ácidos nucléicos e aumentam a seletividade para adsorção do DNA à membrana de sílica-gel fornecida em forma de coluna. O lisato é colocado sobre a coluna, e etanol é adicionado. O conjunto é submetido a centrifugação, e o DNA se liga especificamente à membrana de sílica, enquanto outros contaminantes passam por ela. Há alguns passos de lavagem com tampões fornecidos, e, ao final, há eluição do DNA em tampão pobre em sais, chamado de AE, também fornecido com o kit.

As amostras de DNA genômico foram transportadas em gelo seco até o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, para a realização de imunoeletroforese de DNA (Southern blot) com o auxílio do grupo liderado pelo professor doutor Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues.

Após transporte, a quantificação do DNA genômico foi feita em Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), e a ausência de

degradação foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio (figura 12).

Figura 12: Avaliação da integridade do DNA: gel de agarose contendo brometo de etídio, com amostras de DNA extraído de rins de ratos no protocolo descrito. A imagem mostra a primeira extração descrita, em que houve degradação de parte dos DNAs, para ilustrar as diferenças entre material íntegro (setas brancas) e material degradado (demais). DNA: ácido desoxirribonucleico.

3.8.3. Técnica de extração de RNA total enriquecido em pequenos RNAs

Rins armazenados a -80°C foram utilizados para a extração de RNA total, com consequente remoção de grandes RNAs, resultando em RNA total enriquecido em pequenos RNAs. Para tanto, foi utilizado o kit comercial “mirVana® miRNA Isolation Kit” (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

Para a realização do protocolo, 250 mg de tecido renal congelado foram triturados em nitrogênio líquido, em cadinho sobre gelo. O tecido pulverizado foi dissolvido em tampão de lise fornecido pelo kit, e solução aditiva para homogenato de miR, do kit, é acrescentada. Após, adiciona-se a mistura ácido-fenol:clorofórmio e a solução é centrifugada a $10.000 \times g$ por 5 minutos à temperatura ambiente.

A fase aquosa é recuperada após a centrifugação, associada a etanol absoluto, e passada por um cartucho de filtro. Após algumas lavagens, o RNA total mantém-se aderido ao filtro. Acrescenta-se solução de eluição fornecida pelo kit a 95°C , com centrifugação a $10.000 \times g$ por 20 a 30 segundos. A solução obtida contém RNA total.

A solução de RNA total é misturada a $1/3$ de volume com etanol absoluto, pipetada em um cartucho de filtro e centrifugada a $10.000 \times g$ por 15 segundos para imobilizar grandes RNAs no filtro, que é desprezado. Após, faz-se nova adição de etanol absoluto à solução coletada, desta vez a $2/3$ do volume, e se passa por novo filtro, com centrifugação a $10.000 \times g$, desta vez com imobilização de RNAs pequenos no filtro, que é mantido. Faz-se algumas lavagens e, após, solução de eluição a 95°C é acrescentada no cartucho de filtro, para a coleta de solução de RNA total enriquecida em pequenos RNAs.

3.9. Avaliação da expressão de proteínas e miRs em tecido renal

3.9.1. Western blot (imunoeletroforese de proteína)

Amostras contendo 30 µg de proteína renal total foram utilizadas para avaliar a expressão de βgal, p21, p16, HO-1 e MnSOD. Amostras de 30µg de proteína de membrana de células renais foram utilizadas no estudo de AQP2 e Klotho.

As amostras proteicas foram submetidas à eletroforese em minigel de poliacrilamida de 8 a 12% de concentração. Após transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose (Hybond-P; GE Healthcare, Reino Unido), as amostras foram tratadas com leite em pó desnatado a 5% diluído em tampão Tris (TBS) (Tris base 2,42g/L, NaCl 2,92g/L, EDTA 0,336g/L, pH = 7,5) com 1mL de Tween-20, por 1 hora, e posteriormente incubadas com os anticorpos primários específicos, por toda a noite, a 4°C.

Os anticorpos primários estudados foram os seguintes:

- AQP2 (sc-9882, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), em diluição 1:10.000
- βgal (G6282, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), em diluição 1:1.000
- Klotho (sc-22220, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), em diluição 1:500
- p21 (sc-397, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), em diluição 1:500
- p16 (sc-759, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), em diluição 1:1.000
- TGFβ (sc-146, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), em diluição 1:1.000 em 1% de leite desnatado
- HO-1 (BML-HC3001, Assay designs, Ann Arbor, EUA), em diluição 1:1.000
- MnSOD (10011389, Cayman Chemical, Ann Arbor, EUA), em diluição 1:4.000

- actina (sc-1615 , Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), em diluição 1:2.000

Após alguns passos de lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário por 1 hora, a temperatura ambiente. Os anticorpos secundários eram conjugados com peroxidase, e os utilizados foram:

- anti-rabbit (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), em diluição 1:2.000 (para os anticorpos primários HO-1, MnSOD, p21, p16 e TGF β)
- anti-goat (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), em diluição 1:10.000 (para os anticorpos primários AQP2, Klotho e actina)
- anti-mouse (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), em diluição 1:2.000 (para o anticorpo primário β gal)

A detecção da peroxidase ligada ao anticorpo conjugado secundário foi feita usando sistema de quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Reino Unido), e as imagens foram geradas por exposição ao aparelho Alliance 4.2 (UVITEC, Cambridge). As bandas obtidas foram analisadas após densitometria (Image J, NIH, Bethesda, EUA), e normalizadas pela densitometria das bandas originadas pela hibridização da actina.

3.9.2. qPCR

A técnica de qPCR foi utilizada para a quantificação de miRs em tecido renal dos animais eutanasiados no segundo dia após a lesão de IR. Os miRs investigados neste experimento foram: miR-29a, miR 29-b, miR 335 e miR-34a e, para pesquisa de genes referência para comparação (também conhecidos como “housekeeping”), os genes RNU48, RNU44, U47 e U6. Para cada amostra, foram utilizados 5 ng de RNA total enriquecido em pequenos RNAs, e cada amostra foi feita em duplicata de poços. Como controles negativos para a reação de qPCR foram utilizados poços que continham o mix da reação mais os primers específicos para cada miR, mas não continham o DNA complementar (cDNA).

Os primers utilizados foram os seguintes (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA):

miR-29a (002112)	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
miR 29-b (000413)	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
miR 335 (000546)	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU
miR-34a (000426)	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
RNU48 (001006)	GATGACCCCAGGTAAGTCTGAGTGTGTGCTGATGCCATCACCGCAGCGC TCTGACC
RNU44 (001094)	CCTGGATGATGATAGCAAATGCTGACTGAACATGAAGGTCTTAATTAGCTCT AACTGACT
U47 (001223)	TAATGATTCTGCCAAATGAAATATAATGATATCACTGTAAACCGTTCCATTT TGATTCTGAGGT
U6 (001973)	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAACGATACAGAGAAGAT TAGCATGGCCCCTGCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATA TTTT

Tabela 1 - Sequências dos primers utilizados nas reações de qPCR: A primeira coluna contém os nomes dos miRs a que se referem os primers, com o número de identificação utilizado para

sua aquisição na Life Technologies entre parênteses. A segunda coluna mostra a sequência de nucleotídeos de cada primer. As primeiras quatro linhas, em preto, mostram primers de miRs de interesse, e as últimas quatro linhas, em cinza, mostram sequências de DNAs candidatos a gene referência (“housekeeping”).

O kit “TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit” (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) foi utilizado de acordo com as orientações do fabricante. Nele, há a preparação de um mix de reação contendo nucleotídeos e transcriptase reversa, que associamos às amostras de RNA e aos primers específicos para a obtenção de cDNA pela reação de transcrição reversa (figura 13A), que foi feita em termocicladora nas seguintes condições: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C e 4°C após. O cDNA gerado foi armazenado a -20°C por 24 horas, até seu uso na reação de qPCR propriamente dita.

Para a reação de qPCR foi usado TaqMan® Universal PCR Master Mix II (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA. Contém DNA polimerase, nucleotídeos e sonda repórter), associado ao cDNA obtido previamente e aos primers específicos para esta reação para cada miR, submetidos às seguinte condições em termocicladora: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C mais 60 segundos a 60°C . Há síntese da segunda fita de DNA (figura 13B), e logo uma sonda repórter se liga ao DNA no meio da sequência (figura 13C). Inicia-se a amplificação, e quando a DNA polimerase alcança a região de ligação da sonda repórter, há emissão de sinal fluorescente (figura 13D). Quanto maior a amplificação, maior o sinal fluorescente captado.

Primeiro passo: transcrição reversa

(A)

Segundo passo: qPCR

(B)

Ciclo 1

(C)

A sonda se anela especificamente em região entre os primers "forward" e "reverse"

Ciclo 2

(D)

A DNA polimerase quebra as sondas que foram hibridizadas pelo alvo

Adaptado de TaqMan® Small RNA Assays Protocol

Figura 13: Experimento de transcrição reversa e qPCR: o experimento acontece em dois passos. (A) O primeiro passo consiste na transcrição reversa, em que um primer chamado de RT, específico para cada miR, é acrescentado à amostra de RNA total enriquecido de pequenos RNAs e a uma mistura de nucleotídeos e transcriptase reversa. Após reação em termocicladora, obtém-se uma amostra contendo cDNA de cada miR em estudo. O segundo passo consta da reação de qPCR, em que há associação de outros primers, específicos para cada miR, com as amostras de cDNA geradas, e TaqMan® Universal PCR Master Mix II, que contém DNA polimerase, nucleotídeos e sonda repórter. (B) Há síntese da segunda fita do DNA. (C) A sonda repórter se liga ao DNA no meio da sequência. (D) Quando, à amplificação, a DNA polimerase alcança a região de ligação da sonda repórter, há emissão de sinal

fluorescente. RNA: ácido ribonucleico; RT: transcrição reversa; miR: microRNA; cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar; qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa

Não foi detectada a presença dos genes referência RNU48, RNU44 ou U47, sendo que o gene U6 foi escolhido como gene de referência em nossas análises. A análise foi feita utilizando o programa DataAssist[®] Software (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), e os resultados foram dados em $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que corrige a quantidade de ácido nucleico de interesse pela do gene referência, e compara os resultados com o grupo controle.

Mais detalhadamente, após a amplificação, o que temos é o seguinte:

1. O limiar de cada corrida foi determinado como o ponto em que a amplificação atinge a fase logarítmica. É conhecido pelo nome em inglês, “cycle threshold” (Ct) (figura 14B);
2. O valor de Ct é encontrado pelo programa após determinação do limiar. Corresponde ao número de ciclos necessário para que o sinal fluorescente passe o limiar, não representando mais background. Dessa forma, quanto maior o Ct, menor a quantidade de ácido nucleico de interesse presente na amostra;
3. Calculou-se o delta Ct (ΔCt) de cada amostra a partir da diferença entre os valores de Ct do miR de interesse e do valores de Ct de U6:

$$\Delta Ct = Ct (\text{miR de interesse}) - Ct U6$$

4. Após, calculou-se a média dos ΔCt das amostras do grupo controle. A diferença entre o ΔCt de cada amostra e o ΔCt da média dos controles em determinado miR de interesse gera o valor de $\Delta\Delta Ct$ para aquela amostra naquele miR:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{miR de interesse da amostra analisada}) - \Delta Ct (\text{miR de interesse da média do grupo controle})$$

5. A fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi aplicada, resultando no valor da expressão gênica relativa.

Figura 14: Quantificação da expressão gênica por análise de qPCR: a figura (A) mostra graficamente a evolução do qPCR no termociclador: cada cor de curva representa um miR diferente em estudo na microplaca. Entre os ciclos 18 e 20 passa a haver aumento importante do sinal fluorescente. (B) Quando o aumento do sinal fica mais homogêneo, estabelece-se o limiar do ciclo, demonstrado pela seta azul.

3.10. Avaliação de parâmetros de senescência replicativa

3.10.1. Ensaio para medição do comprimento de telômeros

A técnica de Southern blot, ou imuno eletroforese de DNA, foi utilizada para o ensaio de aferição do comprimento telomérico em amostras de DNA extraído de tecido renal, com o uso do kit comercial “TeloTAGGG Telomere Length Assay[®]” (Roche, Basel, Suíça).

Para cada amostra, foram utilizados 2 mg de DNA genômico, que foram digeridos pela enzima de restrição Fast Digest HinfI (4 μ L para cada 2mg de DNA) (Thermo Scientific FD0804) (figura 15A) a 37°C por 2 horas. Esta enzima tem especificidade que a impede de fragmentar DNA telomérico e sub-telomérico, permitindo a formação de fragmentos de restrição telomérica (FRT), analisados ao final.

As amostras de DNA digerido foram aplicadas em gel de agarose a 0,8% diluído em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE), logo após a aplicação de marcador padrão de peso molecular acoplado com digoxigenina (DIG) (figura 15B), com aplicação de corrente elétrica de 80V e corrida por 4 horas. Após, o gel foi incubado com ácido clorídrico, que é capaz de quebrar pontes dissulfeto, e com soluções de desnaturação e neutralização, para abertura da dupla-hélice do DNA. A seguir, a transferência para membrana de nylon foi feita utilizando tampão salina-sódio-citrato (SSC) concentrado 20 vezes, com ascensão por arraste hidrodinâmico capilar do DNA do gel para a membrana ao longo de toda a noite (figura 15C).

O DNA se liga à membrana após exposição ultravioleta, obtida com o aparato UV Crosslinker (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Reino Unido) a $1,2 \times 10^5 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ (figura 15D), e a membrana é incubada por 3 horas, a 42°C, com a sonda telomérica 5'-TTAGGG-3' marcada com DIG (figuras 15E e 15F). Após algumas lavagens, a membrana é, então, hibridizada com anticorpo anti-DIG ligado a fosfatase alcalina (figura 15G). Acrescenta-se CDP-star à membrana, um substrato quimioluminescente da fosfatase alcalina, permitindo a visualização da localização da sonda telomérica imobilizada. As imagens

foram obtidas pelo aparelho ImageQuant 350 system (GE Healthcare, Reino Unido), e analisadas de duas formas diferentes, como descrito abaixo.

Figura 15: Southern blot para análise de comprimento de telômeros. (A) Digestão do DNA genômico com a enzima de restrição Fast Digest HinfI, que não fragmenta DNA telomérico ou sub-telomérico; (B) O DNA fragmentado é aplicado em gel de agarose, e submetido a corrente elétrica (eletroforese), com separação dos fragmentos de acordo com o tamanho. O marcador de tamanho molecular é marcado com DIG; (C) Os fragmentos de DNA separados por tamanho são transferidos para membrana de nylon; (D) A exposição ultravioleta é necessária para ligar o DNA transferido à membrana; (E) A membrana com o DNA é hibridizada com sonda específica para telômeros, marcada com DIG; (F) Foto ilustrativa da membrana incubada com a sonda específica para telômeros; (G) Há incubação da membrana contendo DNA, sonda para telômeros e DIG com anticorpo anti-DIG marcado com fosfatase alcalina, que reagindo com substrato quimioluminescente acrescentado posteriormente, permitirá a visualização da localização da sonda telomérica. DNA: ácido desoxiribonucleico; DIG: digoxigenina

A localização do FRT marcado pela sonda permite que, por comparação com o marcador padrão de peso molecular, possa-se saber o tamanho daquele fragmento (e, portanto, o comprimento daquele telômero). A forma

tradicional de análise de comprimento de telômeros por Southern blot é feita com a análise da média dos FRT de cada amostra.

Entretanto, sabe-se que independentemente da média do comprimento dos telômeros em uma célula, se um único telômero for extremamente curto, isto já pode levar esta célula à senescência ¹⁷⁷. A análise do comprimento de telômeros em rins de ratos pode ser inadequada apenas com a média dos FRT, sendo que a complementação com outro tipo de análise pode ser importante ¹⁷⁸. Dessa forma, além da média dos FRT, foi feita a comparação entre diferentes intervalos de comprimento e a porcentagem de telômeros em cada intervalo. Os telômeros foram avaliados quanto à sua porcentagem entre os curtos (<8,6Kb), médios (8,6 a 21,2Kb) e longos (>21,2Kb).

Para esta análise, utilizou-se o método a seguir:

A imagem revelada do Southern blot do comprimento de telômeros foi dividida em uma grade (figura 16A), para avaliar a luminescência em cada área correspondente a um tamanho de DNA, em Kb (figura 16B). A maioria dos telômeros continha sinal quimioluminescente até a linha de grade número 10, então dividiu-se os telômeros da seguinte forma: linhas 1, 2 e 3 (> 21,2Kb): onde localizavam-se os telômeros longos; linhas 4, 5 e 6 (entre 8,6 e 21,2Kb): onde se localizavam os telômeros médios; linhas 7, 8, 9 e 10: (<8,6Kb): onde se localizavam os telômeros curtos (figura 16C).

O sinal quimioluminescente (conhecido como OD na análise usual de FRT) de cada linha foi analisado, e a soma de todo o sinal quimioluminescente por telômero foi realizada (figura 16C). Cada linha representou um percentual do sinal total (figura 16C), e os percentuais dentro de cada grupo (curtos, médios e longos) foram somados (figura 16D). Desta forma, estabeleceu-se o percentual de telômeros curtos, médios e longos dentro de cada amostra.

Figura 16: Análise da porcentagem de telômeros em diferentes intervalos de comprimento. (A) Os telômeros foram alocados em uma grade que permitiu a divisão dos tamanhos dos fragmentos de forma mais precisa. (B) O marcador de tamanho demonstrou que a maior parte dos telômeros situava-se nas 10 primeiras linhas de grade; (C) As 10 primeiras linhas de grade foram divididas em três grupos: fragmentos com mais de 21,2Kb (longos); fragmentos entre 8,6 e 21,2Kb (médios) ; e fragmentos com menos de 8,6Kb (curtos). O sinal quimioluminescente encontrado foi considerado para cada fragmento, e o percentual que aquele fragmento representa no telômero total foi considerado (proporção em relação à soma); (D) os percentuais de cada grupo de comprimento foram somados, para se estabelecer o percentual total de fragmentos curtos, médios ou longos em cada amostra total de telômero.

3.10.2. Estudo para avaliar a atividade de telomerase intrínseca

A avaliação do comprimento telomérico, mesmo com análises de porcentagens de telômeros por grupos de comprimentos, pode não ser adequada para a análise de senescência replicativa em alguns tipos de experimentos. Estudos que avaliaram marcadores de senescência e balanço oxidativo já mostraram insucesso na demonstração de variação no tamanho dos telômeros, porém com demonstração de variação na atividade de telomerase intrínseca do tecido estudado, sem que houvesse alteração em seus níveis proteicos ou de RNA ⁷⁴. Dessa forma, optamos por estudar também a atividade intrínseca de telomerase em tecido renal.

Para tanto, foi utilizado o kit comercial “TeloTAGGG telomerase PCR ELISA[®]” (Roche, Basel, Suíça), que mistura técnicas de PCR e de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA).

Para esta análise, foram utilizados 25 µg de proteína total de amostras de rins, que foram colocadas em mistura para reação contendo Taq DNA polimerase, nucleotídeos e dois tipos particulares de primers (figura 17A):

- um primer biotinilado específico para a repetição telomérica TTAGGG, que funciona como substrato para a telomerase, importante para a primeira fase da reação;
- outro primer específico para a repetição TTAGGG, porém anti-senso em relação ao primeiro primer.

Foi feita incubação da mistura para reação com as amostras proteicas em termociclador, inicialmente a 25°C por 30 minutos, para permitir que a telomerase intrínseca das amostras renais adicionasse sequências de telômeros ao primer-substrato biotinilado. A seguir, um ciclo de 5 minutos a 94°C inativou a atividade da telomerase, e nos 30 ciclos subsequentes ocorreu a amplificação das sequências por PCR (figura 17A).

Encerrada a fase de PCR, inicia-se a fase de ELISA: os amplicons gerados são desnaturados e hibridizados com uma sonda que reconhece a sequência TTAGGG, marcada com DIG (figura 17B). Adiciona-se anti-DIG

conjugado com peroxidase (figura 17C), e, a seguir, um substrato da peroxidase, o TMB (figura 17D).

Desta forma, se há intensa atividade de telomerase há mais sequências teloméricas inseridas e amplificadas pelos primers, com mais ligação de sondas marcadas com DIG, com maior quantidade de peroxidase e maior coloração exibida quando há contato da enzima com seu substrato tetrametilbenzidina (TMB).

Como controle positivo de reação foi utilizado lisato de células HEK293 fornecido pelo kit, e como controle negativo foi utilizado extrato proteico renal inativado pelo calor a 85°C por 10 minutos. A intensidade da coloração foi avaliada em leitor de microplaca ELISA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

Figura 17: Ensaio para quantificar a atividade intrínseca de telomerase. (A) Primeira fase da reação, que consta de um ensaio de PCR. O primer 1, biotinilado funciona como substrato para a telomerase. Quanto maior a atividade da telomerase intrínseca presente no extrato de proteínas renais estudado, maior será o acréscimo de seqüências teloméricas no primer 1. Há interrupção na atividade da telomerase pela ascensão da temperatura a 94°C, e uma reação de amplificação do substrato alongado começa com o primer 2; (B) as amostras são colocadas em microplaca para ELISA coberta com estreptavidina, que se liga à biotina e fixa as amostras na placa. Um probe específico para a seqüência telomérica, marcado com digoxigenina, é acrescentado; (C) acrescenta-se anticorpo anti-digoxigenina marcado com peroxidase; (D) a adição de TMB, um substrato da peroxidase, permite que cor seja gerada.

3.11. Análise estatística

A análise estatística e os gráficos a ela relacionados foram gerados com o auxílio do programa *Graphprism* 5.0.

As variáveis contínuas foram avaliadas com cálculo de média e erro-padrão, com cálculo de diferença entre os grupos por análise de variância (ANOVA), utilizando análise de Tukey como pós-teste, por tratar-se de teste não-pareado com número diferente de amostras entre os grupos.

A análise histológica, categórica, foi feita por teste de qui-quadrado.

Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das células-tronco mesenquimais

As células obtidas após cultura dos explantes de cordão umbilical tinham o formato fusiforme típico das CTM (figura 18A). Além disso, apresentavam as três condições propostas para a caracterização como células mesenquimais multipotentes, de acordo com a declaração da Sociedade Internacional de Terapia Celular ¹⁷⁹: (1) eram aderentes a superfícies plásticas quando mantidas em condições padrão de cultura; (2) expressavam CD105, CD73 e CD90 e eram negativas para marcadores hematopoiéticos como CD34, CD45, HLA-DR e CD3 (figura 18B); (3) foram capazes de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica *in vitro* (figura 18C).

Figura 18: Caracterização das células cultivadas: (A) Células fusiformes presentes nas culturas obtidas a partir do cordão umbilical; (B) Análise de imunofluorescência por citometria de fluxo das chCTM. A marcação foi negativa para CD3, CD34, HLA-DR e CD45 e positiva para CD73, CD90 e CD105; (C) Análise da capacidade de diferenciação mesodérmica das chCTM.

4.2. Função renal e tubular

4.2.1. Parâmetros clínicos e bioquímicos

A primeira fase da análise de função renal foi o estudo da evolução da lesão gerada pelo modelo em nossos animais, com e sem o uso das chCTM como tratamento. Para isso, foram realizados os três experimentos de curva de uréia descritos na seção “Materiais e métodos”.

A primeira curva de uréia foi realizada com isquemia de 30 minutos, e aplicação de 1×10^6 chCTM por via EV quando o tratamento foi instituído, e não houve IRA significativa, mesmo no grupo não tratado (figura 19A). Não houve diferença estatística entre os animais do grupo C e grupo IR, sendo que a uréia de pico foi atingida no primeiro dia após a isquemia. Em D1, a uréia do grupo IR foi $75,5 \pm 14,4$ mg/dL, enquanto a do grupo C foi $38 \pm 2,9$ mg/dL. Interessante notar que, já neste momento, a uréia do grupo que recebeu tratamento endovenoso com chCTM foi maior no primeiro dia após a lesão que a do grupo IR ($94,2 \pm 14,3$ mg/dL), porém sendo significativamente diferente apenas em relação ao grupo C. Já no terceiro dia após a isquemia há retorno aos níveis basais, praticamente iguais entre os grupos (em D3: C: $42,3 \pm 1,2$ mg/dL; IR: $49,7 \pm 5,0$ mg/dL; CTM: $50,2 \pm 7,7$ mg/dL). Dessa forma, por não haver diferença entre os grupos C e IR, este modelo não foi aplicado.

A segunda curva de uréia aconteceu com isquemia por 45 minutos e aplicação de 1×10^6 chCTM por via EV quando o tratamento foi instituído, e nela a IRA induzida foi bastante grave. O pico de lesão aconteceu após 48 horas da indução da isquemia, e a uréia plasmática dos animais do grupo IR foi $405,3 \pm 103,2$ mg/dL, contra $41,0 \pm 4,0$ mg/dL do grupo controle. Os níveis de uréia passaram a cair a partir do terceiro dia pós-isquemia (figura 19B), mas não atingiram o nível basal até o sexto dia, quando esta curva foi interrompida. Neste experimento, os animais tratados com chCTM por via EV também apresentaram pico de uréia no segundo dia após a isquemia, sem diferença em relação ao grupo IR, e significativamente diferente do grupo C (uréia de CTM em D2: $460,5 \pm 56,5$ mg/dL). Porém, antes disso, no primeiro dia após a isquemia, o grupo CTM apresentou nível plasmático de uréia superior ao nível

do grupo IR, com significância estatística (em D1: C: $38,0 \pm 2,9$ mg/dL; IR: $283,0 \pm 23,3$ mg/dL; CTM: $429,3 \pm 18,2$ mg/dL; $p < 0,05$ para: C vs IR, C vs CTM e IR vs CTM) (figura 19B). Dessa forma, como os resultados foram controversos à literatura, foi pensada na hipótese de as chCTM estarem concentradas demasiadamente para aplicação EV, conforme explicação já realizada na seção “Materiais e métodos”.

Dessa forma, realizou-se a terceira e última curva de uréia, em que a isquemia foi realizada por 45 minutos e 1×10^6 chCTM foram diluídas em 2 mL de salina e aplicadas por via IP. Confirmou-se que o pico de uréia plasmática acontece no segundo dia após a indução de isquemia (uréia do grupo IR em D2: $257 \pm 41,1$ mg/dL, contra $52,0 \pm 2,5$ mg/dL do grupo C, $p < 0,05$) e, desta vez, em consenso com a literatura, o tratamento com as chCTM levou à redução dos níveis de uréia em relação ao grupo IR (uréia do grupo CTM em D2: $122 \pm 22,6$ mg/dL; $p < 0,05$ vs C e $p < 0,05$ vs IR). No grupo CTM, o pico de lesão aconteceu precocemente em relação ao grupo IR, no primeiro dia após a isquemia, com valor de pico de $193,2 \pm 33,6$ mg/dL. A partir do segundo dia já houve queda dos valores de uréia no grupo tratado com chCTM, sendo que no quarto dia pós lesão os valores já estavam muito próximos aos do grupo C (em D4: C: $42,5 \pm 1,7$ mg/dL; CTM: $67,5 \pm 10,2$ mg/dL, p : NS) (figura 19C). O grupo IR, entretanto, ainda apresentava valores elevados de uréia ao quarto dia ($139,2 \pm 43,4$ mg/dL), apesar de não ser significativamente diferente do demais. Apenas no sétimo dia após a lesão os níveis de uréia do grupo IR tornaram-se mais próximos dos valores dos outros grupos (no sétimo dia após a isquemia: C: $32,6 \pm 5,7$ mg/dL; IR: $59,8 \pm 14,8$ mg/dL; CTM: $43,7 \pm 4,5$ mg/dL) (figura 19C).

Desta forma, os animais do grupo CTM apresentaram menor pico de lesão após a isquemia (uréia em D1 de CTM: $193,2 \pm 33,6$ mg/dL vs uréia de D2 em IR: $257 \pm 41,1$ mg/dL), menor uréia plasmática em todos os dias em comparação com o grupo IR (com diferença estatisticamente significativa em D2), e recuperação mais rápida que a apresentada pelo grupo IR (figura 19C).

Figura 19: Curvas de uréia: (A) Resultado do experimento de isquemia renal bilateral por 30 minutos, com reperusão posterior, e aplicação de 1×10^6 chCTM EV nos ratos tratados após 6 horas da indução da lesão, com coleta de uréia diária até D6; (B) Resultado do experimento de isquemia renal bilateral por 45 minutos, com reperusão posterior, e aplicação de 1×10^6 chCTM EV nos ratos tratados após 6 horas da indução da lesão, com coleta de uréia diária até D6; (C) Resultado do experimento de isquemia renal bilateral por 45 minutos, com reperusão

posterior, e aplicação de 1×10^6 chCTM IP nos ratos tratados após 6 horas da indução da lesão, com coleta de uréia diária até D7. EV: endovenoso; IP: intraperitoneal; C: grupo controle; IR: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico; CTM: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM.

Para confirmar este achado, os níveis de creatinina plasmática diários foram avaliados, com cálculo de depuração de creatinina no segundo e no sétimo dias pós-isquemia, ambos mais precisos para avaliação de filtração glomerular que o valor de uréia plasmática apenas.

Os resultados foram muito semelhantes: o pico de lesão marcado pela creatinina plasmática também aconteceu no segundo dia, quando o valor de creatinina nos animais do grupo IR foi significativamente diferente dos valores dos grupos C e CTM (C: $0,30 \pm 0,02$ mg/dL; IR: $2,3 \pm 0,40$ mg/dL; CTM: $0,98 \pm 0,21$ mg/dL, $p < 0,05$ para C vs IR e para IR vs CTM) (figura 20B). A depuração de creatinina neste momento foi compatível, com os seguintes valores: C: $0,59 \pm 0,04$ mL/min/100g de peso; IR: $0,09 \pm 0,02$ mL/min/100g de peso; CTM: $0,24 \pm 0,06$ mL/min/100g de peso; $p < 0,05$ para C vs IR, para C vs CTM e para IR vs CTM. Dessa forma, pela depuração de creatinina o tratamento com chCTM também se mostrou nefroprotetor, ainda que parcialmente.

Da mesma forma que com a uréia plasmática, já houve queda dos valores de creatinina no grupo tratado com chCTM a partir do segundo dia (creatinina plasmática em D1 para CTM: $1,60 \pm 0,60$ mg/dL; e em D2: $0,98 \pm 0,21$ mg/dL), com valores já muito próximos aos do grupo C a partir do quarto dia pós lesão nos animais tratados (C: $0,30 \pm 0,00$ mg/dL; IR: $1,17 \pm 0,39$ mg/dL; CMT: $0,50 \pm 0,10$ mg/dL, p : NS) (figura 20B).

No sétimo dia após a lesão, os níveis de creatinina plasmática do grupo IR também tornaram-se mais próximos dos valores dos outros grupos (no sétimo dia após a isquemia: C: $0,30 \pm 0,00$ mg/dL; IR: $0,66 \pm 0,18$ mg/dL; CTM: $0,52 \pm 0,19$ mg/dL, p : NS) (figura 20B), assim como a depuração de creatinina (C: $0,54 \pm 0,04$ mL/min/100g de peso; IR: $0,25 \pm 0,06$ mL/min/100g de peso; CTM: $0,22 \pm 0,03$ mL/min/100g de peso; p : NS).

Além disso, no segundo e no sétimo dias após a indução da isquemia, foi avaliada também a FENa e o volume de diurese desses animais. A FENa dos animais do grupo IR foi significativamente maior que a dos outros grupos no segundo dia após a isquemia (C: $0,1 \pm 0,01\%$; IR: $2,2 \pm 0,63\%$; CTM: $0,42 \pm 0,11\%$, $p < 0,05$ para IR vs C e para IR vs CTM), mantendo-se ainda elevada até o sétimo dia pós-lesão (C: $0,1 \pm 0,01\%$; IR: $0,38 \pm 0,13\%$; CTM: $0,14 \pm 0,02\%$; $p < 0,05$ para IR vs C e para IR vs CTM) (figura 20C).

Figura 20: Evolução dos parâmetros de função renal: os parâmetros foram coletados de animais dos grupos controle, grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico e grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM. Os resultados demonstrados foram obtidos durante o experimento da terceira curva de uréia. (A) Curva de uréia plasmática, já apresentada na figura 19C; (B) Curva de creatinina plasmática; (C) Evolução da FENa de D2 a D7; (D) Evolução no volume urinário de D2 a D7. C: grupo controle; IR: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico; CTM: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM; FENa: fração de excreção de sódio. * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs CTM.

O volume urinário no segundo dia pós-isquemia estava bastante aumentado nos grupos IR e CTM em relação ao controle (C: $0,002 \pm 0,0004$ mL/min/100g de peso; IR: $0,005 \pm 0,0006$ mL/min/100g de peso; CTM:

0,006±0,0009 mL/min/100g de peso; $p < 0,05$ para C vs IR e para C vs CTM) (figura 20D), enquanto no sétimo dia apenas o grupo CTM apresentava volume de diurese semelhante ao grupo C (C: 0,002±0,0005 mL/min/100g de peso; IR: 0,004±0,0009 mL/min/100g de peso; CTM: 0,002±0,0003 mL/min/100g de peso; $p < 0,05$ para C vs IR e para IR vs CTM) (figura 20D).

Os principais parâmetros de função renal no momento do pico da lesão, segundo dia pós-isquêmico, podem ser resumidos na tabela 2 abaixo.

Parâmetros			
	Controle	IR2	CTM2
Uréia	52±2.5	257±41.1 ^{*#}	122±22.6 [*]
Creatinina	0.3±0.02	2.3±0.40 ^{*#}	0.98±0.21
Depuração de creatinina	0.59±0.04	0.09±0.02 ^{*#}	0.24±0.06 [*]
FENa	0.10±0.01	2.20±0.63 ^{*#}	0.42±0.11
Volume urinário	0.002±0.0004	0.005±0.0006 [*]	0.006±0.0009 [*]

Tabela 2 - Análise clínica e bioquímica de função renal no segundo dia pós-isquemia. Uréia (mg/dL); Creatinina (mg/dL); Depuração de creatinina (mL/min/100g peso); FENa (fração de excreção de sódio,%); Volume urinário (mL/min/100g peso). IR2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D2; CTM2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D2. ^{*} $P < 0,05$ vs. Controle; [#] $P < 0,05$ vs. CTM2.

A partir desses achados o modelo de isquemia por 45 minutos com infusão de 1×10^6 chCTM IP após 6 horas de reperfusão foi instituído, e repetido para as todas as outras análises a seguir.

Pela visualização macroscópica, a diurese dos animais do grupo CTM parecia mais concentrada que a diurese dos animais do grupo IR (figuras 21a e 21B). A osmolalidade em urina de 24 horas foi avaliada após 2 dias da lesão isquêmica, já que os achados iniciais sugeriam déficit de concentração urinária.

Os animais do grupo IR apresentavam osmolalidade de 354 ± 24 mOsm/Kg H_2O , enquanto os animais do grupo CTM apresentavam valor de 450 ± 23 mOsm/Kg H_2O ($p < 0,05$) (figura 21C). Apesar de ambos os valores estarem bem abaixo do valor de osmolalidade urinária esperada para um rato WKY normal, cerca de 1500 mOsm/Kg H_2O ¹⁸⁰, a comparação entre os grupos submetidos à isquemia demonstrou déficit de concentração urinária menos proeminente no grupo CTM.

Figura 21: Diurese do segundo dia pós-isquemia. Foram coletadas amostras de animais dos grupos IR2, IR7 (resumidos como IR), CTM2 e CTM7 (resumidos como CTM) nas 24 horas entre D1 e D2. A figura (A) demonstra o volume total coletado após 24h de gaiola metabólica para os grupos IR e CTM. Visualmente o volume urinário de CTM já parece menor que o de IR. Em (B) vemos a comparação do aspecto em relação à coloração. A figura (C) demonstra graficamente a comparação entre as osmolalidades urinárias dos grupos IR e CTM no segundo dia após a isquemia. IR: grupo submetido à isquemia e perfusão renal sem tratamento específico, CTM: grupo submetido à isquemia e perfusão renal tratado com células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano. # $p < 0,05$ vs CTM.

Para complementar o estudo de função tubular, a expressão renal de AQP2 em membranas foi avaliada, e os resultados estão a seguir.

4.2.2. Expressão de AQP2

A expressão de AQP2 renal foi investigada em fração proteica de membrana, avaliando apenas os canais já inseridos para exercer sua função no túbulo coletor renal.

A análise por Western blot semiquantitativo revelou que a lesão de isquemia-reperfusão levou à redução da expressão de AQP2 nos animais do grupo IR2, em consenso com a literatura encontrada no assunto ^{181; 182}. Conforme demonstrado nas figuras 22A e 22B, o grupo CTM2 teve expressão de AQP2 completamente restabelecida (C: $99,5 \pm 0,5\%$; IR2 $55,3 \pm 3,8\%$; CTM2: $90,0 \pm 7,0\%$; $p < 0,05$ em C vs IR2 e em IR2 vs CTM2).

No sétimo dia após isquemia, a expressão de AQP2 no grupo CTM7 foi semelhante à do grupo C (CTM7: $96,7 \pm 3,3\%$ vs C: $92,5 \pm 7,5\%$; p : NS). Interessante, entretanto, foi a expressão de AQP2 no grupo IR7, que foi estatisticamente maior que nos grupos C e CTM7 (IR7: $205,7 \pm 2,3\%$, $p < 0,05$ entre C e IR7 e entre IR7 e CTM7) (figuras 22A e 22C).

Figura 22: Expressão de AQP2 em fração de proteínas de membranas de tecido renal. (A) Imunoblots contra AQP2 em D2 e D7. Análise densitométrica de amostras de grupo controle, grupo isquemia sem tratamento e grupo isquemia tratado com chCTM (B) em D2; (C) em D7. C: grupo controle; IR2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D2; CTM2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D2. IR7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D7; CTM7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D7. * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs CTM2, ## $p < 0,05$ vs CTM7.

Os dados sugerem que o tratamento com chCTM reduz as alterações induzidas pela isquemia em túbulos renais, com melhora em parâmetros como volume urinário, FENa, osmolalidade urinária e expressão tubular de AQP2.

4.2.3. Avaliação histológica de lesão tubular

O compartimento túbulo-intersticial é o local de maior acometimento renal após a lesão de IR, e o equivalente histológico encontrado à análise histomorfológica é a NTA, visualizada nas lâminas coradas em PAS de todos os grupos submetidos à IR (IR2, IR7, CTM2 e CTM7).

No segundo dia após a IR, os grupos IR2 e CTM2 são muito semelhantes quanto ao índice de lesão tubular, com cerca de 70 a 80% dos campos analisados apresentando índice de lesão acima de 50% no campo (figuras 23A, 23B e 23C).

Entretanto, no sétimo dia, enquanto mais de 50% dos animais do grupo IR7 apresentavam lesão tão grave (>50% no campo) (figuras 23D e 23F), o grupo CTM7 continha apenas 25% dos animais com tal intensidade de lesão (figuras 23E e 23F). O grupo CTM7 mostrava, na maior parte das lâminas, lesão histológica moderada, correspondendo a 75% dos animais com lesão entre 26 e 50% no campo. Este grau menor de lesão foi encontrado em menos de 15% dos animais do grupo IR7.

A figura 23 mostra exemplos de cortes histológicos estudados nos quatro grupos citados, com gráficos demonstrando a porcentagem de lesão tubular de cada grupo, dividida em quartis (<10%; 10 a 25%; 26 a 50% e >50%), em D2 e em D7.

Figura 23: Avaliação histomorfométrica renal. Representação de microscopia óptica com coloração ácido periódico-Schiff nos grupos (A) IR2; (B) CTM2; (D) IR7; (E) CTM7. (C) Representação gráfica do índice de necrose tubular aguda em D2; (F) Representação gráfica

do índice de necrose tubular aguda em D7. Magnificação de 100X. C: grupo controle; IR2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D2; CTM2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D2. IR7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D7; CTM7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D7. p: NS.

4.3. Estudo de imuno-histoquímica de infiltração leucocitária em tecido renal

4.3.1. Infiltração macrofágica

A avaliação da infiltração renal de macrófagos foi realizada por meio de reação de imuno-histoquímica em lâminas hibridizadas com anticorpo CD68.

A lesão de IR levou a intenso infiltrado inflamatório em região córtico-medular renal, com presença de células positivas para molécula CD68 muito aumentada em relação a rins de animais do grupo C. Tanto em D2 (figuras 24B e 24D) quanto em D7 (figuras 24E e 24G), a marcação para macrófagos foi intensa nos animais isquêmicos não-tratados.

Após dois dias de lesão, os animais do grupo IR2 apresentavam $32,6 \pm 2,3$ células/ $0,087\text{mm}^2$ (figuras 24B e 24D), enquanto os animais controle tinham apenas $3,4 \pm 0,3$ células/ $0,087\text{mm}^2$ (figura 24A) ($p < 0,05$ entre C e IR2). Da mesma forma, os animais IR7 apresentavam elevação ainda maior, com $52,9 \pm 3,9$ células/ $0,087\text{mm}^2$ ($p < 0,05$ entre C e IR7) (figuras 24E e 24G).

O tratamento com chCTM levou à redução do infiltrado macrofágico em rins, tanto no segundo (figuras 24C e 24D) quanto no sétimo dias (figuras 24F e 24G) após a indução de IR. Os animais do grupo CTM2 apresentavam apenas $13,1 \pm 1,0$ células/ $0,087\text{mm}^2$ (figuras 24C e 24D) ($p < 0,05$ entre IR2 e CTM2 e entre C e CTM2), e o grupo CTM7 evidenciava somente $27,3 \pm 1,6$ células/ $0,087\text{mm}^2$ (figuras 24F e 24G) ($p < 0,05$ entre IR7 e CTM7 e entre C e CTM7).

Figura 24: Infiltração macrófaga em tecido renal. Número de células positivas para CD68 em 0,087mm² de túbulo-interstício. (A) Imagem representativa do grupo controle; (B) Imagem representativa do grupo IR2; (C) Imagem representativa do grupo CTM2; (D) Representação gráfica da infiltração de macrófagos em D2; (E) Imagem representativa do grupo IR7; (F) Imagem representativa do grupo CTM7; (G) Representação gráfica da infiltração de macrófagos em D7. C: grupo controle; IR2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D2; CTM2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D2. IR7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D7; CTM7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D7. * p<0,05 vs C, # p< 0,05 vs CTM2, ## p< 0,05 vs CTM7.

4.3.2. Infiltração linfocitária

Reação de imuno-histoquímica para CD3 foi utilizada para avaliação de infiltrado de linfócitos em tecido renal.

Após dois dias da lesão de IR, os rins dos animais IR2 (figura 25B) apresentavam uma quantidade de linfócitos significativamente menor que os rins do grupo C (figura 25A) em região córtico-medular ($0,7 \pm 0,1$ células/ $0,087\text{mm}^2$ em IR2 e $3,4 \pm 0,5$ células/ $0,087\text{mm}^2$ em C; $p < 0,05$) (figura 25D). O tratamento com chCTM não alterou isso, com a presença de $1,4 \pm 0,2$ células/ $0,087\text{mm}^2$ em MSC2 (figuras 25C e 25D) ($p < 0,05$ entre C e CTM2).

Entretanto, após 7 dias de lesão, ambos os grupos submetidos à IR evidenciaram aumento importante na quantidade de linfócitos infiltrados em tecido renal, sem diferença entre os animais que receberam ou não chCTM (IR7: $23,9 \pm 2,7$ células/ $0,087\text{mm}^2$ e CTM7: $19,3 \pm 1,7$ células/ $0,087\text{mm}^2$ ($p < 0,05$ entre C e IR7, e entre C e CTM7; p : NS entre IR7 e CTM7) (figuras 25E, 25F e 25G).

Figura 25: Infiltração linfocitária em tecido renal. Número de células positivas para CD3 em 0,087mm² de túbulo-interstício. (A) Imagem representativa do grupo controle; (B) Imagem representativa do grupo IR2; (C) Imagem representativa do grupo CTM2; (D) Representação gráfica da infiltração de linfócitos em D2; (E) Imagem representativa do grupo IR7; (F) Imagem representativa do grupo CTM7; (G) Representação gráfica da infiltração de linfócitos em D7. C: grupo controle; IR2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D2; CTM2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D2. IR7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D7; CTM7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D7. * $p < 0,05$ vs C.

4.4. Avaliação da expressão de marcadores de senescência

A análise de marcadores de senescência renal foi feita por meio de duas técnicas distintas: (1) Western blot para avaliação da expressão proteica de β gal, Klotho, p21, p16 e TGF β após 2 e 7 dias da lesão de IR; (2) qPCR para estudo quantitativo de miR-29a, miR-29b, miR-34a e miR-335 em tecido renal após 2 dias da lesão de IR.

Animais do grupo IR2 demonstraram aumento de expressão de marcadores de senescência em praticamente todos os parâmetros avaliados, com exceção de miR-29b e miR-335, e o grupo CTM2 teve atenuação de todas as alterações apresentadas após a isquemia. Após 7 dias da lesão de IR, já não houve diferença importante entre os grupos quanto aos parâmetros de senescência estudados (figura 26).

Figura 26: Marcadores de senescência. Análise densitométrica de amostras dos grupos controle, com isquemia sem tratamento e com isquemia tratado com chCTM (A) βgal em D2; (B) βgal em D7; (C) Klotho em D2; (D) Klotho em D7; (E) p21 em D2; (F) p21 em D7; (G) p16 em D2; (H) p16 em D7; (I) TGFβ em D2; (J) TGFβ em D7. (K) Imunoblots contra βgal, Klotho, p21, p16 e TGFβ em D2 e D7. Análise por qPCR da expressão renal em D2 dos grupos controle, com isquemia sem tratamento e com isquemia tratado com chCTM de (L) miR-29a; (M) miR-34a; (N) miR-29b; (O) miR-335. C: grupo controle; IR2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D2; CTM2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D2; IR7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D7; CTM7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D7; miR: microRNA. *p<0,05 vs C; # p< 0,05 vs CTM2; ** p = 0,05 vs C; ^ p = 0,05 vs CTM2; ## p< 0,05 vs CTM7.

A expressão de β gal renal no grupo IR2 estava aumentada em relação ao grupo controle (IR2: $176,7 \pm 21,9\%$ vs C: $97,0 \pm 3,3\%$; $p < 0,05$), e foi parcialmente normalizada no grupo CTM2 ($108,0 \pm 4,2\%$; $p < 0,05$ vs IR2) (figuras 26A e 26K). Após sete dias da lesão de IR, todos os grupos apresentavam expressão semelhante de β gal renal (C: $95,0 \pm 5,0\%$; IR7: $99,5 \pm 0,5\%$; CTM7: $96,5 \pm 1,5\%$; p : NS)(figuras 26B e 26K).

A proteína Klotho, em consonância com a literatura, estava menos expressa no grupo IR2, com aumento de expressão se aplicado o tratamento com chCTM (C: $101,0 \pm 1,0\%$; IR2: $30,0 \pm 5,8\%$; CTM2: $85,0 \pm 11,2\%$; $p < 0,05$ entre C e IR2 e entre IR2 e CTM2) (figuras 26C e 26K). Ao sétimo dia pós-lesão, ainda há redução da expressão de Klotho renal, mas ela deixa de ser significativa em relação ao controle (IR7: $62,5 \pm 13,8\%$ vs C: $102,5 \pm 2,5\%$, p : NS). O tratamento com chCTM não interferiu na expressão de Klotho após 7 dias da IR (CTM7: $87,5 \pm 8,5\%$, p : NS) (figuras 26D e 26K). Klotho foi estudada em fração proteica de membrana, por ser esta sua localização principal na célula.

A expressão da proteína anti-proliferativa p21 também foi condizente com o encontrado em outros trabalhos, estando aumentada nos animais do grupo IR2 (C: $93,8 \pm 3,8\%$ e IR2: $181,3 \pm 23,8\%$; $p < 0,05$). O grupo CTM2 demonstrou expressão reduzida de p21 renal em comparação ao grupo IR2 (CTM2: $120,0 \pm 14,1\%$; $p < 0,05$ entre IR2 e CTM2) (figuras 26E e 26K), e ao sétimo dia pós-IR, a expressão de p21 em todos os grupos atingiu valores semelhantes (C: $100,0 \pm 0,0\%$; IR7: $100,0 \pm 2,0\%$; CTM7: $97,5 \pm 1,5\%$; p : NS) (figuras 26F e 26K).

A proteína p16 apresentou-se com aumento em expressão renal ao segundo dia pós-isquemia, com normalização quando houve o tratamento com chCTM (C: $102,5 \pm 2,5\%$; IR2: $156,7 \pm 9,3\%$; CTM2: $96,7 \pm 4,4\%$; $p < 0,05$ entre C e IR2 e entre IR2 e CTM2) (figuras 26G e 26K). No caso da p16, as mesmas alterações foram encontradas após sete dias da lesão, com C: $105,0 \pm 5,0\%$; IR7: $166,7 \pm 8,8\%$ e CTM7: $110 \pm 2,9\%$; ($p < 0,05$ entre C e IR7 e entre IR7 e CTM7) (figuras 26H e 26K).

A figura 26I mostra graficamente a expressão da proteína pró-fibrótica TGF β após 2 dias da indução da IR (os blots podem ser vistos na figura 26K). Houve elevação na expressão de TGF β no grupo IR2, com recuperação de valores próximos ao normal no grupo CTM2 (C: 100,0 $\pm$ 5,5%; IR2: 124,0 $\pm$ 2,2%; CTM2: 99,73 $\pm$ 6,0%; $p < 0,05$ entre C e IR2 e entre IR2 e CTM2). Em D7, todos os grupos apresentaram expressão semelhante de TGF β em tecido renal, como observado nas figuras 26J e 26K (C: 99,5 $\pm$ 0,5%; IR7: 99,5 $\pm$ 1,5%; CTM7: 98,5 $\pm$ 0,5%; p : NS).

As figuras 26L, 26M, 26N e 26O representam graficamente a análise quantitativa da expressão de miRs em tecido renal de ratos eutanasiados no segundo dia após lesão de IR.

A expressão de miR-29a e de miR-34a foi aumentada no grupo IR2 em relação ao grupo C, com redução de expressão no grupo CTM2 (figuras 26L e 26M) (análise feita em $2^{-\Delta\Delta C_t}$: miR-29a: C: 1,0 $\pm$ 0,3; IR2: 4,6 $\pm$ 1,1; CTM2: 0,3 $\pm$ 0,2; $p < 0,05$ entre IR2 e CTM2; miR-34a: C: 1,0 $\pm$ 0,0; IR2: 8,7 $\pm$ 2,7; CTM2: 0,7 $\pm$ 0,5; $p = 0,05$ entre C e IR2 e entre IR2 e CTM2).

Os microRNAs miR-29b e miR-335 não tiveram diferença em expressão entre os grupos (figuras 26N e 26O), provavelmente não estando envolvidos na via de senescência relacionada à lesão de IR (miR-29b: C: 2,2 $\pm$ 2,0; IR2: 7,7 $\pm$ 6,8; CTM2: 5,1 $\pm$ 4,3; p : NS; miR-335: C: 1,1 $\pm$ 0,4; IR2: 0,5 $\pm$ 0,0; CTM2: 0,2 $\pm$ 0,1; p : NS).

4.5. Estudo da expressão de enzimas associadas ao estresse oxidativo

A análise por Western blot da expressão de HO-1 e de MnSOD em amostras de proteínas totais extraídas de tecido renal permitiu a avaliação de vias do estresse oxidativo na lesão de IR e no tratamento com chCTM.

A lesão de IR estimulou a produção de HO-1 renal ao segundo dia após isquemia (C: $97,8 \pm 1,4\%$; IR2: $163,3 \pm 34,4\%$; $p < 0,05$) (figuras 27A e 27B), mas isso não foi capaz de levar ao aumento da enzima anti-oxidante MnSOD (C: $100,0 \pm 1,6\%$; IR2: $38,3 \pm 2,0\%$; $p < 0,05$) (figuras 27A e 27C). Quando o tratamento com chCTM foi realizado, os níveis de MnSOD em D2 se elevaram acima dos níveis dos controle (figuras 27A e 27C), mesmo sem aumento importante nos níveis de HO-1 (figuras 27A e 27B) (MnSOD em CTM2: $176,0 \pm 9,3\%$; $p < 0,05$ entre C e CTM2 e entre IR2 e CTM2; HO-1 em CTM2: $100,0 \pm 4,7\%$; $p < 0,05$ vs IR2).

Figura 27: Expressão de enzimas anti-oxidantes (HO-1 e MnSOD) em tecido renal. (A) Imunoblots contra HO-1 e MnSOD em D2 e D7. Análise densitométrica de amostras de grupos controle, com isquemia sem tratamento e com isquemia tratado com chCTM para (B) HO-1 em D2; (C) MnSOD em D2; (D) HO-1 em D7; (E) MnSOD em D7. C: grupo controle; IR2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D2; CTM2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D2. IR7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D7; CTM7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D7. * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs CTM2.

Após sete dias da lesão de IR, a expressão de HO-1 (figuras 27A e 27D) e de MnSOD (figuras 27A e 27E) já se equivalia em todos os grupos (HO-1: C: $97,8 \pm 1,4\%$; IR7: $102,0 \pm 1,8\%$; CTM7: $100,8 \pm 5,6\%$; p: NS; MnSOD: C: $101,0 \pm 1,3\%$; IR7: $77,4 \pm 13,3\%$; CTM7: $106,3 \pm 4,9\%$; p: NS).

4.6. Avaliação da proliferação de células tubulares

A replicação celular foi avaliada por estudo de células positivas para o antígeno PCNA ao método de imuno-histoquímica em tecido renal.

Os animais controle apresentaram baixa proliferação celular, indicada pela presença de $0,5 \pm 0,1$ células positivas/ $0,087\text{mm}^2$ (figura 28A). Os grupos IR2 e CTM2 tiveram índices de proliferação aumentados, e ambos os grupos foram similares entre si (IR2: $15,9 \pm 7,3$ células/ $0,087\text{mm}^2$ e CTM2: $16,1 \pm 8,7$ células/ $0,087\text{mm}^2$; p: NS) (figuras 28B, 28C e 28D).

Após 7 dias de isquemia, a proliferação celular se reduziu, mas o mesmo padrão de relação entre os grupos se manteve (IR7: $4,0 \pm 1,8$ células/ $0,087\text{mm}^2$; CTM7: $5,4 \pm 3,5$ células/ $0,087\text{mm}^2$; p: NS) (figuras 28E, 28F e 28G).

Figura 28: Proliferação tubular. Número de células positivas para antígeno nuclear de células em proliferação em 0,087mm² de túbulo-interstício. (A) Imagem representativa do grupo controle; (B) Imagem representativa do grupo IR2; (C) Imagem representativa do grupo CTM2; (D) Representação gráfica da proliferação tubular em D2; (E) Imagem representativa do grupo IR7; (F) Imagem representativa do grupo CTM7; (G) Representação gráfica da proliferação tubular em D7. C: grupo controle; IR2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D2; CTM2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D2. IR7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D7; CTM7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D7. p= NS.

4.7. Análise de parâmetros de senescência replicativa

4.7.1. Comprimento de telômeros

A avaliação de senescência replicativa se deu através da análise de comprimento de telômeros em DNA genômico extraído de rins, e por avaliação da atividade da enzima telomerase intrínseca em extratos proteicos de tecido renal.

Apesar da elevação de diversos marcadores de senescência renal nos animais submetidos à lesão de IR, não parece haver alteração de marcadores de senescência replicativa nos animais estudados.

Avaliando-se a média dos fragmentos de restrição telomérica, não houve alteração no comprimento de telômeros entre os diferentes grupos, sendo que as medidas encontradas foram: C: $12,5 \pm 1,2$ Kb; IR2: $14,7 \pm 0,2$ Kb; CTM2: $15,0 \pm 0,9$ Kb; IR7: $15,4 \pm 0,5$ Kb e CTM7: $13,2 \pm 1,2$ Kb, p: NS (figura 29).

Figura 29: Avaliação do comprimento de telômeros por análise da média do fragmento de restrição telomérica. (A) Imagem resultante de Southern blot, com marcação indicando os tamanhos dos fragmentos teloméricos em amostras de DNA dos grupos controle, com

isquemia sem tratamento e com isquemia tratado com chCTM, em D2 e D7. Representação gráfica do comprimento da média dos fragmentos de restrição telomérica (B) em D2; (C) em D7. C: grupo controle; IR2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D2; CTM2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D2. IR7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D7; CTM7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D7, FRT: fragmento de restrição telomérica. p= NS.

Os telômeros foram, ainda, avaliados quanto à sua porcentagem entre os curtos (<8,6Kb), médios (8,6 a 21,2Kb) e longos (>21,2Kb). Os resultados se encontram na tabela 3.

	C	IR2	CTM2	IR7	CTM7
Telômeros curtos (<8,6Kb) (%)	43,4±9,1	26,9±0,8	26,4±3,2	23,2±2,0	38,2±7,2
Telômeros médios (8,6 a 21,2Kb) (%)	33,5±1,0	42,3±0,6* ^{##}	39,3±0,4 ^{##}	39,1±0,8 ^{##}	33,0±2,1
Telômeros longos (>21,2Kb) (%)	23,1±8,1	30,8±0,9	34,3±2,8	37,6±2,8	28,8±9,3

Tabela 3 - Avaliação do comprimento de telômeros por análise da proporção de telômeros curtos, médios e longos. C: grupo controle; IR2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D2; CTM2: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D2. IR7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal sem tratamento específico, em D7; CTM7: grupo submetido à lesão de isquemia-reperfusão renal com tratamento com chCTM, em D7. *p< 0,05 em relação C; ^{##} p<0,05 em relação a CTM7

Desta forma, não houve diferença entre os grupos quanto à proporção de telômeros curtos ou longos, demonstrando que o comprimento de telômeros não se altera significativamente com a lesão de IR ou com o tratamento com chCTM nos períodos de tempo estudados.

4.7.2. Atividade de telomerase intrínseca

A atividade de telomerase intrínseca, aferida pelo protocolo de amplificação de repetições teloméricas (TRAP), não demonstrou atividade significativa de telomerase em rins em nenhum grupo, sendo que não houve em nenhuma amostra coloração passível de aferição em leitor de microplaca, exceto pelas 3 amostras de controle positivo (figura 30).

Figura 30: Atividade de telomerase intrínseca renal. Não foi possível aferir atividade de telomerase nas amostras estudadas. A seta indica o controle positivo da reação.

Dessa forma, os dados apresentados demonstram que a lesão de IR cursa com piora de filtração glomerular e função tubular, com aumento de infiltrado leucocitário renal, de marcação pró-oxidativa e de marcadores de senescência, de forma independente de telômeros. O tratamento com jovens chCTM melhora a função renal, atenua a resposta inflamatória e de estresse oxidativo que ocorre na IRA, e reduz a expressão de proteínas e miRs relacionados à senescência.

5. DISCUSSÃO

Demonstramos que a IRA por IR é condição em que existe ativação de estresse oxidativo, com redução de enzimas anti-oxidantes em rins. Há, ainda, inflamação importante, demonstrada pela infiltração leucocitária, principalmente de macrófagos, em interstício renal pós-isquêmico. A elevação de miRs relacionados a senescência e inflamação veio acompanhada de aumento na expressão de proteínas inibidoras do ciclo celular e de outros marcadores de envelhecimento celular, além de redução da proteína Klotho. Os mecanismos pró-senescência aconteceram independentemente do comprimento de telômeros, de forma não replicativa. Na verdade, a intensidade de proliferação de células tubulares não foi diferente entre os grupos tratados e não-tratados, o que corrobora a ausência da influência da replicação celular como mecanismo de geração de senescência.

Conseguimos extrair chCTM com eficácia, e conseguimos reproduzir um modelo que, conforme encontrado por outros autores em literatura, demonstra que chCTM podem amenizar a IRA induzida por IR em ratos^{35; 168}. Mais do que isso, o tratamento com chCTM foi benéfico em reduzir o fenótipo de envelhecimento prematuro induzido por IR.

Dessa forma, pudemos cumprir o objetivo principal e os objetivos específicos do estudo inicialmente proposto.

5.1. Considerações sobre o modelo de IR

O estudo de animais submetidos ao modelo de IR não é simples, e demandou alguns cuidados especiais. A primeira análise realizada em nosso trabalho, a das curvas de uréia, já foi capaz de demonstrar alguns possíveis interferentes com os quais teríamos de nos preocupar ao longo do estudo.

Os valores de uréia dos animais isquêmicos após dois dias da indução da lesão foram muito maiores à ocasião da segunda curva de uréia que à terceira curva (uréia de D2 do grupo IR à segunda curva de uréia: $405,3 \pm 103,2$ mg/dL; uréia de D2 do grupo IR à terceira curva de uréia: $257,0 \pm 41,1$ mg/dL), apesar de o modelo e o insulto cirúrgico terem sido os mesmos. Muitos fatores devem ser considerados quando usamos o modelo de IR.

Apesar de sabermos que o modelo de IR em ratos é um pouco mais homogêneo que em camundongos, sabemos que se trata de um modelo experimental passível de muitas variáveis interferentes. O tempo de cirurgia, o grau de hidratação do animal, a temperatura do animal e do ambiente nos momentos peri e pós-operatórios, e até mesmo o fato de os animais pertencerem a diferentes colônias de uma mesma cepa, podem fazer com que eles apresentem variação na resposta clínica à lesão de IR.

Para tentar minimizar essas variações, utilizamos em nosso estudo ratos singênicos, homogêneos entre si por terem a mesma constituição genética. A mesma pessoa foi responsável por todos os procedimentos de IR do estudo, e a temperatura dos animais durante as cirurgias foi controlada para que todos se mantivessem entre 35 e 36,5°C de temperatura retal. Sempre que estudávamos um grupo específico, fazíamos as cirurgias e os estudos de gaiola metabólica de todos os animais relacionados ao mesmo tempo, para evitar que fatores como a temperatura externa ou o percentual de umidade do ar pudessem interferir nas análises. Dessa forma, cada curva de uréia aconteceu em uma ocasião, porém todos os animais analisados na curva (exceção apenas aos controles) foram estudados de uma única vez. Da mesma forma, aconteceu entre os animais eutanasiados em D2 e entre os animais eutanasiados em D7. Dessa forma, apesar de haver variação importante entre

animais submetidos ao mesmo modelo entre dias diferentes de curvas de uréia distintas, sabemos que entre os animais IR2 e CTM2 as diferenças relacionadas ao modelo, e não ao tratamento, devem ser mínimas, pois esses animais foram estudados exatamente no mesmo momento. O mesmo aconteceu entre os animais IR7 e CTM7.

5.2. Considerações sobre o uso das chCTM

Sabendo-se que o mecanismo de ação das CTM é basicamente parácrino, e que a injeção de microvesículas derivadas de células-tronco também pode ser nefroprotetora, o uso do meio de cultura condicionado parece tentador como terapia, pois poderia exercer os mesmos efeitos benéficos de melhora da IRA ^{139; 149} sem as possíveis desvantagens de um alo ou xenotransplante de células.

Entretanto, alguns estudos têm mostrado certa controvérsia quanto a esses resultados, e há relatos de que o meio condicionado, apesar de apresentar fatores pró-angiogênicos, pode não ser tão eficaz quanto as CTM em si no tratamento de IRA por IR ¹³². Isto pode acontecer, talvez, pelo fato de que algumas das principais propriedades imunoreguladoras das CTM dependem do contato célula-célula ^{126; 183}, e não poderiam ser estabelecidas sem sua presença.

A dose de microvesículas utilizada tem sido variável em literatura, e depende do animal e do modelo de IRA utilizado. Em IRA induzida por glicerol, já foi demonstrado benefício no uso de 15 µg de proteínas de microvesículas por camundongo, comparável ao uso de $7,5 \times 10^4$ células ¹³⁹. Entretanto, na maioria dos modelos de IRA, a dose utilizada é de cerca de 50 a 100µg de proteínas ^{35; 184; 185} por animal (ratos e camundongos). Para a produção de 50 a 100µg de proteína, podem ser necessárias até 6×10^7 células em cultura ¹⁸⁶. Dessa forma, a demanda de células pode ser maior no uso de microvesículas do que com a aplicação das próprias células ¹³⁹, o que dificultaria seu uso clínico.

Em www.clinicaltrials.gov há um único estudo em andamento propondo o uso de microvesículas em humanos, para tratamento pancreático do *Diabetes mellitus* tipo 1. No ensaio proposto, são sugeridas duas doses, cada uma delas equivalente à quantidade de microvesículas produzida no sobrenadante de $1,22$ a $1,51 \times 10^6$ CTM (derivadas de sangue de cordão umbilical)/Kg, de forma endovenosa. Este estudo está sendo realizado por grupo do Egito, e ainda não tem resultados parciais.

Dessa forma, ainda não temos evidência de que o uso clínico de microvesículas possa ser factível. Conhecendo esses fatos, com o intuito de facilitar o processo de geração da terapia, optamos pelo uso das chCTM, e não de seu meio condicionado.

5.3. A IR leva a dano renal predominantemente tubular

Neste estudo, foi demonstrado que a isquemia arterial renal bilateral por 45 minutos em ratos, com consequente reperfusão, leva à IRA, que é mais proeminente após 2 dias da indução do insulto. Neste momento de maior gravidade, a lesão é predominante tubular, e cursa com queda na filtração glomerular, aumento na fração de excreção de sódio urinário, queda na osmolalidade urinária e poliúria, provavelmente devido à redução na expressão de AQP2 em túbulos coletores, além de NTA intensa, e de grande infiltrado macrofágico renal.

Após sete dias da indução da IR, a função renal já começou e se restituir. Apesar de poliúria persistente, a expressão renal de AQP2 já estava elevada neste momento, talvez num mecanismo compensatório para restabelecer débito urinário adequado. A FENa começou a cair, e os valores de uréia e creatinina plasmáticas atingiram valores praticamente normais. A NTA já tornou-se mais branda que antes, e a proliferação tubular, apesar de ainda importante, foi menor, como demonstrado por PCNA. O infiltrado inflamatório renal continuou presente, e até mesmo mais proeminente nesta fase de recuperação.

5.4. A IR promove desbalanço oxidativo e leva à senescência renal precoce

EROs são fisiologicamente modulados por enzimas anti-oxidantes, como as superoxidodismutases (SODs). A SOD 2 também é conhecida como SOD de manganês (MnSOD), e é responsável pela redução de EROs dentro da mitocôndria ¹⁸⁷. Esta enzima é ativada pela HO-1 via produção de monóxido de carbono ¹⁸⁸. Quando a atividade medular renal de HO está bloqueada, existe uma redução nos níveis de MnSOD ¹⁸⁹.

A lesão de IR envolveu o desbalanço de vias de estresse oxidativo, em que, apesar de aumento na expressão de HO-1, houve uma redução contraditória na expressão da enzima anti-oxidante MnSOD, definindo um estado pró-oxidante. Em roedores submetidos à IR, a MnSOD renal encontra-se reduzida, e seus níveis se elevam quando a lesão começa a se resolver ¹⁹⁰. Em nosso modelo, a IR levou a elevação na expressão de HO-1 em D2, mas isto não correspondeu a aumento na expressão de MnSOD. Na verdade, a enzima MnSOD estava até mesmo diminuída nos rins dos animais pós-isquêmicos.

Dessa forma, pode-se especular que a IR estimula vias de estresse oxidativo através da inibição de produção de MnSOD dependente de HO-1.

A deficiência de Klotho já foi associada com estado de exacerbado estresse oxidativo ⁹³, e ela pode ser considerada um marcador bem-definido de IRA induzida por IR ⁶¹. Neste estudo pudemos demonstrar que a expressão da proteína Klotho encontra-se reduzida após a IR, e que há concomitante elevação de miR-29a, previamente demonstrado como superexpresso em estados de deficiência de Klotho ¹¹⁰. Além disso, pudemos mostrar que o miR-34a, relacionado a estados de senescência e estresse oxidativo, também está aumentado nos rins após a lesão de IR. A indução desses fatores pode ter servido como gatilho para um estado geral pró-senescente, com elevação de marcadores como β gal, p21, p16 and TGF β .

No sétimo dia pós-isquemia, com a melhora da função renal, a expressão da maior parte dos marcadores de estresse oxidativo e senescência se normalizou.

A IRA já foi associada a diversos aspectos relacionados à senescência, como superexpressão renal de p16 e p21¹⁹¹. Mecanismos que levam à senescência precoce de forma independente de telômeros também já foram associados ao aumento de proteínas inibidoras do ciclo celular¹⁹². Na presença de p21 há indução de expressão renal de β gal, um marcador de aumento de autofagia nas células senescentes⁸³, e já foi demonstrada a indução de aumento da expressão de β gal em rins pós-isquêmicos¹¹⁵. Além disso, tanto a proteína p21¹²¹ quanto o envelhecimento¹⁹³ são capazes de induzir a produção de TGF β , levando a fibrose consequente.

O transplante renal é provavelmente um dos correspondentes clínicos mais relevantes do modelo de IR, e sabe-se que ele pode promover elevação transitória de p21, níveis aumentados sustentados de p16 e indução de β gal¹¹⁷, exatamente como o encontrado nos animais pós-isquêmicos do nosso estudo.

A IR promove senescência, e o envelhecimento também é capaz de contribuir para piora da IRA induzida por IR. O sucesso na função do enxerto renal após o transplante depende de muitas variáveis, mas o fator de maior impacto no mau prognóstico do rim transplantado é a idade do doador: a sobrevida do enxerto é pior quanto maior a idade do doador, principalmente quando acima de 40 anos¹⁹⁴.

Rins que envelheceram expressam mais células senescentes, com maior propensão à fibrose intersticial e atrofia de túbulos renais¹⁹². Mesmo que histologicamente normais, rins mais velhos apresentam maior expressão de β gal e de proteína p16⁵⁷, além da proteína pró-fibrótica TGF β ⁵⁸. A supressão de p16 pode levar a menor fibrose e atrofia tubular¹⁹².

5.5. Há aumento da proliferação celular em todos os grupos submetidos à IR

Mesmo com a ativação de p21, o estudo de PCNA demonstrou aumento de proliferação em células tubulares após a IR. Apesar de parecer um achado contraditório, isto pode ser explicado pelo fato de a lesão de IR também levar à redução da expressão da proteína Klotho renal.

Em estudos de tumores, Klotho já foi demonstrado com capacidade anti-proliferativa, com redução da expressão de PCNA em células de câncer de cólon ¹⁹⁵. Dessa forma, os rins pós-isquêmicos teriam sua proliferação inibida pela expressão aumentada de p21, mas a eles falta a inibição de Klotho.

A proliferação aumentada, no entanto, não foi suficiente para deflagrar mecanismos de senescência replicativa, ao menos nos tempos aqui analisados, pois não foram encontrados encurtamento de telômeros e nem atividade de telomerase acompanhando a situação.

A senescência celular pode acontecer de duas formas diferentes: por via dependente de telômeros, chamada de senescência replicativa, e por via independente de telômeros, mediada por estresse celular. A senescência induzida por estresse pode ser gerada por dano em DNA, liberação de TNF α e inflamação, ou por estresse oxidativo ⁹⁹, sendo que esta última é a via que parece estar ativada em nosso modelo.

5.6. O tratamento com chCTM reduz a lesão renal em ratos isquêmicos

O tratamento com chCTM levou à melhora de função renal em ratos submetidos à lesão de IR. A uréia e a creatinina séricas atingiram um pico menor em comparação às dos os animais não tratados, e a queda em seus valores foi mais precoce, demonstrando uma recuperação mais rápida. A depuração de creatinina foi maior com o tratamento, com FENa menor e osmolalidade um pouco maior no animais tratados. O débito urinário, apesar de tão alto quanto nos animais não tratados no segundo dia pós-isquemia, se reduziu a valores normais em D7, talvez devido à expressão preservada de AQP2, diferentemente do que aconteceu nos animais não tratados. Os índices de NTA, ainda altos em D2, tornaram-se menos intensos nos animais tratados em D7 .

5.7. A infiltração leucocitária é afetada na IR, e parcialmente modulada com o uso de chCTM

A terapia com chCTM reduziu a infiltração renal de macrófagos induzida por IR. Sabe-se que rins normais apresentam poucos macrófagos residentes em seu interstício, mas após insulto isquêmico esse número aumenta consideravelmente ¹⁹⁶. A depleção sistêmica de macrófagos é capaz de atenuar a injúria renal isquêmica ¹⁹⁷, e a infiltração de macrófagos em rins de ratos pode levar ao desenvolvimento de fibrose renal durante a fase de reparação ¹⁹⁸, como consequência de secreção de TGF β . Assim, menor infiltrado macrofágico pode representar menos fibrose renal no futuro.

Em nosso modelo encontramos menor expressão de TGF β nos rins dos animais CTM2, associada a menor infiltrado macrofágico nos rins de todos os grupos tratados com chCTM.

Houve déficit linfocitário em região túbulo-intersticial dos rins após 2 dias do insulto de IR. Já foi demonstrado que, apesar de haver infiltrado renal de linfócitos CD3+ em cerca de 3 horas após a lesão de IR, a quantidade dessas células após 24h se reduz importantemente ¹⁹⁹, corroborando nossos achados de 48h. Em 7 dias da IR os linfócitos, quase inexistentes em D2, estavam muito presentes no compartimento túbulo-intersticial renal em D7. Isto corrobora o conhecimento de que a expressão de quimiocinas, determinante para a migração leucocitária, é maior durante a fase de recuperação, que acontece aproximadamente após 7 dias da lesão ²⁰⁰. Algumas células T regulatórias podem induzir aumento de proliferação tubular após a IR ²⁰¹, e sua presença pode estar aumentada em tecido renal após 10 dias da IR ²⁰².

O tratamento com chCTM, entretanto, não interferiu no infiltrado linfocitário renal, ao contrário do que houve com o infiltrado macrofágico.

5.8. As chCTM reduziram vias de estresse oxidativo e senescência por mecanismos independentes de telômeros

Neste estudo, o tratamento com chCTM levou à redução de estresse oxidativo, com expressão normal de HO-1 levando a níveis aumentados da enzima anti-oxidante MnSOD. Sabemos que vias de estresse oxidativo podem ser moduladas por alguns miRs, como o miR-34a, que é capaz de interferir em enzimas anti-oxidantes ¹⁰⁸ e está associado a outras situações de IRA induzidas por vias oxidativas, como a lesão induzida por cisplatina ²⁰³. Existe, ainda, um aumento na expressão de miR-34a que é idade-dependente, demonstrado em retinas de camundongos ²⁰⁴ e em culturas primárias de fibroblastos humanos senescentes, que expressam mais miR-34a que células jovens ²⁰⁵. Este miR é considerado um marcador de senescência relacionada a estados inflamatórios ⁸¹.

Outro miR associado tanto a senescência quanto a inflamação é o miR-29a ⁸¹, que também se encontra aumentado em situações de deficiência de Klotho ¹¹⁰. Em nossos dados, pudemos demonstrar elevação na expressão de ambos os miRs em rins pós-isquêmicos.

Nos animais tratados houve expressão normal dos diversos marcadores de senescência, mesmo em D2, quando um fenótipo renal de senescência era evidente nos rins pós-isquêmicos. As chCTM preveniram o aumento das proteínas β gal, p21, p16 e TGF β , além de reduzir a expressão de miR-29a e de miR-34a. Além disso, as chCTM preservaram a expressão da proteína Klotho.

Foram investigados outros dois miRs em nosso estudo, miR-29b e miR-335, mas não encontramos correlação deles com a IRA por IR ou com o tratamento com chCTM.

O miR-29b já foi previamente associado com o envelhecimento e a deficiência de Klotho ^{81; 110}, e o miR-335 já foi correlacionado à senescência e ao aumento de estresse oxidativo ¹⁰⁸. Nenhum deles, entretanto, foi relacionado a situações pró-inflamatórias ⁸¹, e talvez essa seja a razão pela qual eles não

estão aumentados em rins após a IR e nem se influenciam pelo tratamento com chCTM.

As alterações em marcadores de senescência não foram seguidas de mudanças no comprimento de telômeros e nem de aumento de atividade de telomerase renal.

Em situações patológicas, como em modelo de sobrecarga de ferro em ratos, a elevação de marcadores de estresse oxidativo é capaz de aumentar a atividade de telomerase intrínseca em fígado ⁷⁴. Apesar de sabermos que a atividade de telomerase em rins de ratos adultos praticamente não é encontrada ⁶², sabemos que em animais jovens, de cerca de 19 dias, ela pode estar presente. Avaliamos se a atividade de telomerase intrínseca em rins de ratos poderia estar ativada, incitando mecanismos de senescência replicativa, mas esse estímulo não aconteceu nos rins dos animais estudados, conforme demonstrado, mesmo em situações de aumento de estresse oxidativo. Assim, não encontramos evidência de que as vias de senescência replicativa possam ser influenciadas por IR ou pelo tratamento com chCTM.

5.9. As chCTM não interferem na proliferação tubular pós-isquêmica

Nos animais tratados, com níveis menores de proteína p21 expressa em rins em comparação aos animais pós-isquêmicos, poderia se esperar aumento na proliferação de células tubulares, pois a p21 é proteína inibitória do ciclo celular. Entretanto, a proliferação não aumentou, mesmo com a falta de p21, e isto se deve à alta presença de proteína Klotho.

Em situações normais, a presença de Klotho inibe a atividade de p21⁹⁶, mas também inibe a proliferação celular¹⁹⁵, evitando o desgaste telomérico por atividade replicativa. A falta de Klotho levaria ao aumento de atividade de p21, mas a inibição de proliferação por Klotho estaria liberada, o que poderia permitir alguma proliferação.

Apesar de a proliferação ser necessária à repopulação dos túbulos lesados, sabe-se que a proliferação muito intensa em algumas fases da IRA pós-isquêmica pode ser prejudicial ao reparo renal⁶⁰. Dessa forma, o não-aumento de proliferação após tratamento com chCTM pode representar efeito benéfico nesta situação.

A falta de inibição de proliferação pelos níveis normais de Klotho fizeram com que a proliferação tubular fosse semelhante entre os grupos isquêmicos com e sem tratamento com chCTM, e talvez este seja o fator responsável por não haver diferença entre os grupos quanto à senescência replicativa: não houve diferença de replicação celular.

6. CONCLUSÕES

A IRA induzida por IR é uma condição marcada por aumento de inflamação, de estresse oxidativo, e por indução de miRs específicos, levando a um estado de senescência renal precoce não replicativa, gerada de forma independente de telômeros.

A extração de chCTM foi realizada com sucesso, com reprodução do modelo de melhora de função renal pós-IR em animais tratados com chCTM. O tratamento com chCTM foi benéfico em reduzir o fenótipo de envelhecimento prematuro induzido.

7. REFERÊNCIAS*

- ¹ DA SILVA, L. B. et al. Evaluation of stem cell administration in a model of kidney ischemia-reperfusion injury. **Int Immunopharmacol**, v. 7, n. 13, p. 1609-16, Dec 2007. ISSN 1567-5769. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17996670> >.
- ² THADHANI, R.; PASCUAL, M.; BONVENTRE, J. V. Acute renal failure. **N Engl J Med**, v. 334, n. 22, p. 1448-60, May 1996. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8618585> >.
- ³ ZUK, A. et al. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. **Am J Physiol**, v. 275, n. 3 Pt 1, p. C711-31, Sep 1998. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9730955> >.
- ⁴ RANGANATHAN, P. et al. Semaphorin 3A inactivation suppresses ischemia-reperfusion-induced inflammation and acute kidney injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 307, n. 2, p. F183-94, Jul 2014. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24829504> >.
- ⁵ WITZGALL, R. et al. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. **J Clin Invest**, v. 93, n. 5, p. 2175-88, May 1994. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7910173> >.
- ⁶ DUFFIELD, J. S.; BONVENTRE, J. V. Kidney tubular epithelium is restored without replacement with bone marrow-derived cells during repair after ischemic injury. **Kidney Int**, v. 68, n. 5, p. 1956-61, Nov 2005. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16221175> >.
- ⁷ LIU, K. D.; BRAKEMAN, P. R. Renal repair and recovery. **Crit Care Med**, v. 36, n. 4 Suppl, p. S187-92, Apr 2008. ISSN 1530-0293. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18382192> >.
- ⁸ HUMPHREYS, B. D. et al. Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 22, p. 9226-31, May 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576461> >.
- ⁹ LAMEIRE, N. H.; VANHOLDER, R. Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 1, p. 21-36, Mar 2004. ISSN 1521-6896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14760872> >.
- ¹⁰ WEI, Q.; DONG, Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 303, n. 11, p. F1487-94, Dec 2012. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993069> >.

- 11 CHATTERJEE, P. K. et al. 5-Aminoisoquinolinone reduces renal injury and dysfunction caused by experimental ischemia/reperfusion. **Kidney Int**, v. 65, n. 2, p. 499-509, Feb 2004. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14717920> >.
- 12 _____. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. **Kidney Int**, v. 58, n. 2, p. 658-73, Aug 2000. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10916089> >.
- 13 FENG, Z. et al. Fresh and cryopreserved, uncultured adipose tissue-derived stem and regenerative cells ameliorate ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. **Nephrol Dial Transplant**, v. 25, n. 12, p. 3874-84, Dec 2010. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921297> >.
- 14 ZAGER, R. A.; ALTSCHULD, R. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. **Am J Physiol**, v. 251, n. 1 Pt 2, p. F87-93, Jul 1986. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3728686> >.
- 15 WARD, J. P. Determination of the Optimum temperature for regional renal hypothermia during temporary renal ischaemia. **Br J Urol**, v. 47, n. 1, p. 17-24, Feb 1975. ISSN 0007-1331. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/236801> >.
- 16 PELKEY, T. J. et al. Minimal physiologic temperature variations during renal ischemia alter functional and morphologic outcome. **J Vasc Surg**, v. 15, n. 4, p. 619-25, Apr 1992. ISSN 0741-5214. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1560550> >.
- 17 DELBRIDGE, M. S. et al. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. **Transplant Proc**, v. 39, n. 10, p. 2983-5, Dec 2007. ISSN 0041-1345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18089305> >.
- 18 GODET, G. et al. Risk factors for acute postoperative renal failure in thoracic or thoracoabdominal aortic surgery: a prospective study. **Anesth Analg**, v. 85, n. 6, p. 1227-32, Dec 1997. ISSN 0003-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390585> >.
- 19 UCHINO, S. et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. **JAMA**, v. 294, n. 7, p. 813-8, Aug 2005. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16106006> >.
- 20 BONVENTRE, J. V.; YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **J Clin Invest**, v. 121, n. 11, p. 4210-21, Nov 2011. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045571> >.

- 21 MEHTA, R. L. et al. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. **Kidney Int**, v. 66, n. 4, p. 1613-21, Oct 2004. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15458458> >.
- 22 BRIVET, F. G. et al. Acute renal failure in intensive care units--causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study Group on Acute Renal Failure. **Crit Care Med**, v. 24, n. 2, p. 192-8, Feb 1996. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8605788> >.
- 23 LANGE, C. et al. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. **Kidney Int**, v. 68, n. 4, p. 1613-7, Oct 2005. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16164638> >.
- 24 CHERTOW, G. M. et al. Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery. **Am J Med**, v. 104, n. 4, p. 343-8, Apr 1998. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9576407> >.
- 25 CERDÁ, J. et al. Epidemiology of acute kidney injury. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 3, n. 3, p. 881-6, May 2008. ISSN 1555-905X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216347> >.
- 26 WALD, R. et al. Chronic dialysis and death among survivors of acute kidney injury requiring dialysis. **JAMA**, v. 302, n. 11, p. 1179-85, Sep 2009. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19755696> >.
- 27 LO, L. J. et al. Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease. **Kidney Int**, v. 76, n. 8, p. 893-9, Oct 2009. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19641480> >.
- 28 HSU, C. Y. et al. The incidence of end-stage renal disease is increasing faster than the prevalence of chronic renal insufficiency. **Ann Intern Med**, v. 141, n. 2, p. 95-101, Jul 2004. ISSN 1539-3704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15262664> >.
- 29 KAUSHAL, G. P.; SHAH, S. V. Challenges and advances in the treatment of AKI. **J Am Soc Nephrol**, v. 25, n. 5, p. 877-83, May 2014. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24480828> >.
- 30 JANG, H. R.; RABB, H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. **Clin Immunol**, v. 130, n. 1, p. 41-50, Jan 2009. ISSN 1521-7035. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18922742> >.

- 31 CHOWDHURY, P.; SACKS, S. H.; SHEERIN, N. S. Minireview: functions of the renal tract epithelium in coordinating the innate immune response to infection. **Kidney Int**, v. 66, n. 4, p. 1334-44, Oct 2004. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15458426> >.
- 32 MORETH, K. et al. Biglycan-triggered TLR-2- and TLR-4-signaling exacerbates the pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Matrix Biol**, v. 35, p. 143-51, Apr 2014. ISSN 1569-1802. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24480070> >.
- 33 MIZUNO, S.; NAKAMURA, T. Prevention of neutrophil extravasation by hepatocyte growth factor leads to attenuations of tubular apoptosis and renal dysfunction in mouse ischemic kidneys. **Am J Pathol**, v. 166, n. 6, p. 1895-905, Jun 2005. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15920173> >.
- 34 YSEBAERT, D. K. et al. T cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury. **Kidney Int**, v. 66, n. 2, p. 491-6, Aug 2004. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15253695> >.
- 35 ZOU, X. et al. Microvesicles derived from human Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells ameliorate renal ischemia-reperfusion injury in rats by suppressing CX3CL1. **Stem Cell Res Ther**, v. 5, n. 2, p. 40, 2014. ISSN 1757-6512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24646750> >.
- 36 GUELER, F. et al. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. **Kidney Int**, v. 66, n. 2, p. 523-7, Aug 2004. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15253702> >.
- 37 LEE, S. et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 2, p. 317-26, Feb 2011. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21289217> >.
- 38 MADSEN KM, T. C. **Anatomy of the kidney**. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 2004.
- 39 GOMEZ, H. et al. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. **Shock**, v. 41, n. 1, p. 3-11, Jan 2014. ISSN 1540-0514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24346647> >.
- 40 GROUP., K. D. I. G. O. K. A. K. I. W. **KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury**. *Kidney inter., Suppl.* 2: 1–138 p. 2012.
- 41 HOGAN, S. E. et al. Current role of sodium bicarbonate-based preprocedural hydration for the prevention of contrast-induced acute kidney injury: a meta-analysis. **Am Heart**

- J, v. 156, n. 3, p. 414-21, Sep 2008. ISSN 1097-6744. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760120> >.
- 42 BOSCH, X.; POCH, E.; GRAU, J. M. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. **N Engl J Med**, v. 361, n. 1, p. 62-72, Jul 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19571284> >.
- 43 HOWARD, S. C.; JONES, D. P.; PUI, C. H. The tumor lysis syndrome. **N Engl J Med**, v. 364, n. 19, p. 1844-54, May 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21561350> >.
- 44 GUEVARA, M. et al. Reversibility of hepatorenal syndrome by prolonged administration of ornipressin and plasma volume expansion. **Hepatology**, v. 27, n. 1, p. 35-41, Jan 1998. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9425914> >.
- 45 SORT, P. et al. Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. **N Engl J Med**, v. 341, n. 6, p. 403-9, Aug 1999. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10432325> >.
- 46 ARROYO, V.; FERNANDEZ, J. Pathophysiological basis of albumin use in cirrhosis. **Ann Hepatol**, v. 10 Suppl 1, p. S6-14, May 2011. ISSN 1665-2681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21566249> >.
- 47 WALD, R. et al. Changing Incidence and Outcomes Following Dialysis-Requiring Acute Kidney Injury Among Critically Ill Adults: A Population-Based Cohort Study. **Am J Kidney Dis**, Dec 2014. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25533599> >.
- 48 CHIAO, H. et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against renal injury after ischemia in mice and rats. **J Clin Invest**, v. 99, n. 6, p. 1165-72, Mar 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9077523> >.
- 49 DOI, K. et al. AP214, an analogue of alpha-melanocyte-stimulating hormone, ameliorates sepsis-induced acute kidney injury and mortality. **Kidney Int**, v. 73, n. 11, p. 1266-74, Jun 2008. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18354376> >.
- 50 MOLITORIS, B. A. et al. siRNA targeted to p53 attenuates ischemic and cisplatin-induced acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 8, p. 1754-64, Aug 2009. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19470675> >.
- 51 VUKICEVIC, S. et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. **J Clin Invest**, v. 102, n. 1, p.

- 202-14, Jul 1998. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9649574> >.
- 52 PICKKERS, P. et al. Alkaline phosphatase for treatment of sepsis-induced acute kidney injury: a prospective randomized double-blind placebo-controlled trial. **Crit Care**, v. 16, n. 1, p. R14, 2012. ISSN 1466-609X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22269279> >.
- 53 MUÑOZ-ESPÍN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 7, p. 482-96, Jul 2014. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954210> >.
- 54 SUZUKI, C. et al. Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 368, n. 1, p. 100-6, Mar 2008. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18222169> >.
- 55 JIANG, M. et al. Autophagy is a renoprotective mechanism during in vitro hypoxia and in vivo ischemia-reperfusion injury. **Am J Pathol**, v. 176, n. 3, p. 1181-92, Mar 2010. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20075199> >.
- 56 LIU, S. et al. Autophagy plays a critical role in kidney tubule maintenance, aging and ischemia-reperfusion injury. **Autophagy**, v. 8, n. 5, p. 826-37, May 2012. ISSN 1554-8635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22617445> >.
- 57 YANG, H.; FOGO, A. B. Cell senescence in the aging kidney. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, n. 9, p. 1436-9, Sep 2010. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705707> >.
- 58 SCHMITT, R.; CANTLEY, L. G. The impact of aging on kidney repair. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 294, n. 6, p. F1265-72, Jun 2008. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287400> >.
- 59 HOCHEGGER, K. et al. p21 and mTERT are novel markers for determining different ischemic time periods in renal ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 292, n. 2, p. F762-8, Feb 2007. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968891> >.
- 60 MEGYESI, J. et al. Positive effect of the induction of p21WAF1/CIP1 on the course of ischemic acute renal failure. **Kidney Int**, v. 60, n. 6, p. 2164-72, Dec 2001. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11737590> >.
- 61 HU, M. C. et al. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. **Kidney Int**, v. 78, n. 12, p. 1240-51, Dec 2010. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20861825> >.

- ⁶² SUZUI, N. et al. The telomerase activities in several organs and strains of rats with ageing. **Lab Anim**, v. 33, n. 2, p. 149-54, Apr 1999. ISSN 0023-6772. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10780818> >.
- ⁶³ BROWN, W. R. Molecular cloning of human telomeres in yeast. **Nature**, v. 338, n. 6218, p. 774-6, Apr 1989. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2541342> >.
- ⁶⁴ GOLUBOVSKAYA, V. M. et al. Telomere shortening, telomerase expression, and chromosome instability in rat hepatic epithelial stem-like cells. **Mol Carcinog**, v. 24, n. 3, p. 209-17, Mar 1999. ISSN 0899-1987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10204805> >.
- ⁶⁵ JENNINGS, B. J. et al. Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney. **FEBS Lett**, v. 448, n. 1, p. 4-8, Apr 1999. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217398> >.
- ⁶⁶ GADALLA, S. M.; SAVAGE, S. A. Telomere biology in hematopoiesis and stem cell transplantation. **Blood Rev**, v. 25, n. 6, p. 261-9, Nov 2011. ISSN 1532-1681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764192> >.
- ⁶⁷ HÄRLE-BACHOR, C.; BOUKAMP, P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 13, p. 6476-81, Jun 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8692840> >.
- ⁶⁸ HIYAMA, K. et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. **J Immunol**, v. 155, n. 8, p. 3711-5, Oct 1995. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7561072> >.
- ⁶⁹ ZAKIAN, V. A. Life and cancer without telomerase. **Cell**, v. 91, n. 1, p. 1-3, Oct 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9335327> >.
- ⁷⁰ ORLANDO, C. et al. Telomerase in urological malignancy. **J Urol**, v. 166, n. 2, p. 666-73, Aug 2001. ISSN 0022-5347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458114> >.
- ⁷¹ WESTHOFF, J. H. et al. Telomere shortening reduces regenerative capacity after acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, n. 2, p. 327-36, Feb 2010. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19959722> >.
- ⁷² CHOUDHURY, A. R. et al. Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. **Nat Genet**,

- v. 39, n. 1, p. 99-105, Jan 2007. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143283> >.
- 73 WILLS, L. P.; SCHNELLMANN, R. G. Telomeres and telomerase in renal health. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 1, p. 39-41, Jan 2011. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21209253> >.
- 74 BROWN, K. E. et al. Increased hepatic telomerase activity in a rat model of iron overload: a role for altered thiol redox state? **Free Radic Biol Med**, v. 42, n. 2, p. 228-35, Jan 2007. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17189828> >.
- 75 PUTERMAN, E. et al. The power of exercise: buffering the effect of chronic stress on telomere length. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10837, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20520771> >.
- 76 HAO, C. M.; HAASE, V. H. Sirtuins and their relevance to the kidney. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, n. 10, p. 1620-7, Oct 2010. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20595677> >.
- 77 WANG, C. et al. Adult-onset, short-term dietary restriction reduces cell senescence in mice. **Aging (Albany NY)**, v. 2, n. 9, p. 555-66, Sep 2010. ISSN 1945-4589. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20844316> >.
- 78 WILLETT, W. C. et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. **Am J Clin Nutr**, v. 61, n. 6 Suppl, p. 1402S-1406S, Jun 1995. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7754995> >.
- 79 CROUS-BOU, M. et al. Mediterranean diet and telomere length in Nurses' Health Study: population based cohort study. **BMJ**, v. 349, p. g6674, 2014. ISSN 1756-1833. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25467028> >.
- 80 CHEN, Q. et al. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 10, p. 4337-41, May 1995. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7753808> >.
- 81 RIPPO, M. R. et al. MitomiRs in human inflamm-aging: a hypothesis involving miR-181a, miR-34a and miR-146a. **Exp Gerontol**, v. 56, p. 154-63, Aug 2014. ISSN 1873-6815. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607549> >.
- 82 SCHERZ-SHOUVAL, R.; ELAZAR, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. **Trends Cell Biol**, v. 17, n. 9, p. 422-7, Sep 2007. ISSN 1879-3088. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17804237> >.

- 83 YOUNG, A. R. et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. **Genes Dev**, v. 23, n. 7, p. 798-803, Apr 2009. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279323> >.
- 84 RYU, S. W. et al. Downregulation of protein kinase CKII is associated with cellular senescence. **FEBS Lett**, v. 580, n. 3, p. 988-94, Feb 2006. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16442104> >.
- 85 SMALL, D. M. et al. Oxidative stress and cell senescence combine to cause maximal renal tubular epithelial cell dysfunction and loss in an in vitro model of kidney disease. **Nephron Exp Nephrol**, v. 122, n. 3-4, p. 123-30, 2012. ISSN 1660-2129. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23735887> >.
- 86 CHEN, J. et al. Soy Protein Isolate Inhibits High Fat Diet-Induced Senescence Pathways in Osteoblasts to Maintain Bone Acquisition in Male Rats. **Endocrinology**, p. en00009999, Jan 2015. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25565110> >.
- 87 ZHANG, J. et al. Soy protein isolate down-regulates caveolin-1 expression to suppress osteoblastic cell senescence pathways. **FASEB J**, v. 28, n. 7, p. 3134-45, Jul 2014. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24719353> >.
- 88 KWAK, J. H. et al. Effects of black soy peptide supplementation on blood pressure and oxidative stress: a randomized controlled trial. **Hypertens Res**, v. 36, n. 12, p. 1060-6, Dec 2013. ISSN 1348-4214. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23924691> >.
- 89 KURO-O, M. Klotho in health and disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 21, n. 4, p. 362-8, Jul 2012. ISSN 1535-3842. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22660551> >.
- 90 KURO-O, M. et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, v. 390, n. 6655, p. 45-51, Nov 1997. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9363890> >.
- 91 LIU, H. et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. **Science**, v. 317, n. 5839, p. 803-6, Aug 2007. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690294> >.
- 92 HU, M. C. et al. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. **Kidney Int**, v. 78, n. 12, p. 1240-51, Dec 2010. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20861825> >.
- 93 OH, H. J. et al. DECREASED CIRCULATING KLOTHO LEVELS IN PATIENTS UNDERGOING DIALYSIS AND RELATIONSHIP TO OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION. **Perit Dial**

- Int, Feb 2014. ISSN 1718-4304. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24497597> >.
- 94 KURO-O, M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. **Biol Chem**, v. 389, n. 3, p. 233-41, Mar 2008. ISSN 1431-6730. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177265> >.
- 95 ZELDICH, E. et al. The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system. **J Biol Chem**, v. 289, n. 35, p. 24700-15, Aug 2014. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25037225> >.
- 96 DE OLIVEIRA, R. M. Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. **FEBS Lett**, v. 580, n. 24, p. 5753-8, Oct 2006. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17014852> >.
- 97 DOI, S. et al. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. **J Biol Chem**, v. 286, n. 10, p. 8655-65, Mar 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21209102> >.
- 98 MAEKAWA, Y. et al. Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation. **Endocrine**, v. 35, n. 3, p. 341-6, Jun 2009. ISSN 1355-008X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19367378> >.
- 99 CARRACEDO, J. et al. Klotho modulates the stress response in human senescent endothelial cells. **Mech Ageing Dev**, Sep 2012. ISSN 1872-6216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000105> >.
- 100 MIRANDA, K. C. et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1203-17, Sep 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990141> >.
- 101 COLLINO, F. et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11803, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668554> >.
- 102 WAHLGREN, J. et al. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 17, p. e130, Sep 2012. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22618874> >.
- 103 NAM, S. Y. et al. Effect of obesity on total and free insulin-like growth factor (IGF)-1, and their relationship to IGF-binding protein (BP)-1, IGFBP-2, IGFBP-3, insulin, and

growth hormone. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 21, n. 5, p. 355-9, May 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9152736> >.

- 104 LORDELO, R. A. et al. [Hormonal axes in obesity: cause or effect?]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 51, n. 1, p. 34-41, Feb 2007. ISSN 0004-2730. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435853> >.
- 105 FU, T. et al. Aberrantly elevated microRNA-34a in obesity attenuates hepatic responses to FGF19 by targeting a membrane coreceptor β -Klotho. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 40, p. 16137-42, Oct 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22988100> >.
- 106 WOLF, I. et al. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 56, p. 7094-105, Nov 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762812> >.
- 107 GONG, Z. et al. Reductions in serum IGF-1 during aging impair health span. **Aging Cell**, v. 13, n. 3, p. 408-18, Jun 2014. ISSN 1474-9726. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24341939> >.
- 108 BAI, X. Y. et al. miR-335 and miR-34a Promote renal senescence by suppressing mitochondrial antioxidative enzymes. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 7, p. 1252-61, Jul 2011. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719785> >.
- 109 FABBRI, M. et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 31, p. E2110-6, Jul 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753494> >.
- 110 TAKAHASHI, M. et al. Reduction of Type IV Collagen by Upregulated miR-29 in Normal Elderly Mouse and klotho-Deficient, Senescence-Model Mouse. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48974, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23139829> >.
- 111 BOEHM, M.; NABEL, E. G. Cell cycle and cell migration: new pieces to the puzzle. **Circulation**, v. 103, n. 24, p. 2879-81, Jun 2001. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11413073> >.
- 112 CHKHOTUA, A. B. et al. Up-regulation of cell cycle regulatory genes after renal ischemia/reperfusion: differential expression of p16(INK4a), p21(WAF1/CIP1) and p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor genes depending on reperfusion time. **Transpl Int**, v. 19, n. 1, p. 72-7, Jan 2006. ISSN 0934-0874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16359379> >.

- 113 KASHANI, K. et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. **Crit Care**, v. 17, n. 1, p. R25, 2013. ISSN 1466-609X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23388612> >.
- 114 LEONTIEVA, O. V.; BLAGOSKLONNY, M. V. CDK4/6-inhibiting drug substitutes for p21 and p16 in senescence: duration of cell cycle arrest and MTOR activity determine geroconversion. **Cell Cycle**, v. 12, n. 18, p. 3063-9, Sep 2013. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23974099> >.
- 115 LI, K. L. et al. [Effect of p21 on the changes in renal tubular epithelial cells after ischemia/reperfusion injury of kidney]. **Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue**, v. 17, n. 10, p. 606-10, Oct 2005. ISSN 1003-0603. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16259919> >.
- 116 MELK, A. Senescence of renal cells: molecular basis and clinical implications. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 12, p. 2474-8, Dec 2003. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14605266> >.
- 117 JOOSTEN, S. A. et al. Telomere shortening and cellular senescence in a model of chronic renal allograft rejection. **Am J Pathol**, v. 162, n. 4, p. 1305-12, Apr 2003. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651622> >.
- 118 WANG, X.; BONVENTRE, J. V.; PARRISH, A. R. The aging kidney: increased susceptibility to nephrotoxicity. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 9, p. 15358-76, 2014. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25257519> >.
- 119 SHIMIZU, M. H. et al. Influence of age and vitamin E on post-ischemic acute renal failure. **Exp Gerontol**, v. 39, n. 5, p. 825-30, May 2004. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15130677> >.
- 120 SÖRENSEN-ZENDER, I. et al. Renal tubular Notch signaling triggers a prosenescent state after acute kidney injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 306, n. 8, p. F907-15, Apr 2014. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24573392> >.
- 121 MEGYESI, J. et al. Increased expression of p21WAF1/CIP1 in kidney proximal tubules mediates fibrosis. **Am J Physiol Renal Physiol**, p. ajprenal.00489.2014, Nov 2014. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428126> >.
- 122 XU, Y. Q.; LIU, Z. C. Therapeutic potential of adult bone marrow stem cells in liver disease and delivery approaches. **Stem Cell Rev**, v. 4, n. 2, p. 101-12, 2008. ISSN 1550-8943. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18481229> >.
- 123 BASSI, E. J.; AITA, C. A.; CÂMARA, N. O. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? **World J Stem Cells**, v. 3, n. 1, p. 1-8,

- Jan 2011. ISSN 1948-0210. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21607131> >.
- 124 KEYSER, K. A.; BEAGLES, K. E.; KIEM, H. P. Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation. **Cell Transplant**, v. 16, n. 5, p. 555-62, 2007. ISSN 0963-6897. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708345> >.
- 125 SANTANA, A. C. et al. Protective effects of human amniotic fluid stem cells in a model of aorta allograft vasculopathy in rats. **Transplant Proc**, v. 44, n. 8, p. 2490-4, Oct 2012. ISSN 1873-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23026627> >.
- 126 BASSI, E. J. et al. Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes. **Diabetes**, v. 61, n. 10, p. 2534-45, Oct 2012. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688334> >.
- 127 CAVAGLIERI, R. C. et al. Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model. **Transplant Proc**, v. 41, n. 3, p. 947-51, Apr 2009. ISSN 0041-1345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376395> >.
- 128 SEMEDO, P. et al. Immunosuppressive and remodelling properties of mesenchymal stem cells in a model of chronic kidney disease. **Einstein**, v. 7, n. 4, p. 469-479, 2009.
- 129 _____. Mesenchymal stem cells ameliorate tissue damages triggered by renal ischemia and reperfusion injury. **Transplant Proc**, v. 39, n. 2, p. 421-3, Mar 2007. ISSN 0041-1345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17362746> >.
- 130 TÖGEL, F. et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 289, n. 1, p. F31-42, Jul 2005. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713913> >.
- 131 TSUDA, H. et al. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. **Cell Transplant**, v. 23, n. 7, p. 889-99, 2014. ISSN 1555-3892. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23562186> >.
- 132 XING, L. et al. Mesenchymal stem cells, not conditioned medium, contribute to kidney repair after ischemia-reperfusion injury. **Stem Cell Res Ther**, v. 5, n. 4, p. 101, 2014. ISSN 1757-6512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25145540> >.
- 133 GATTI, S. et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury.

Nephrol Dial Transplant, v. 26, n. 5, p. 1474-83, May 2011. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21324974> >.

- 134 TAN, J. et al. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 307, n. 11, p. 1169-77, Mar 2012. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22436957> >.
- 135 PERICO, N. et al. Mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: pretransplant infusion protects from graft dysfunction while fostering immunoregulation. **Transpl Int**, v. 26, n. 9, p. 867-78, Sep 2013. ISSN 1432-2277. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23738760> >.
- 136 REINDERS, M. E. et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. **Stem Cells Transl Med**, v. 2, n. 2, p. 107-11, Feb 2013. ISSN 2157-6564. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349326> >.
- 137 FANG, T. C. et al. Proliferation of bone marrow-derived cells contributes to regeneration after folic acid-induced acute tubular injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, n. 6, p. 1723-32, Jun 2005. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814835> >.
- 138 BROEKEMA, M. et al. Determinants of tubular bone marrow-derived cell engraftment after renal ischemia/reperfusion in rats. **Kidney Int**, v. 68, n. 6, p. 2572-81, Dec 2005. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16316332> >.
- 139 BRUNO, S. et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 5, p. 1053-67, May 2009. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19389847> >.
- 140 MORIGI, M. et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 7, p. 1794-804, Jul 2004. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15213267> >.
- 141 HERRERA, M. B. et al. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. **Kidney Int**, v. 72, n. 4, p. 430-41, Aug 2007. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507906> >.
- 142 _____. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. **Int J Mol Med**, v. 14, n. 6, p. 1035-41, Dec 2004. ISSN 1107-3756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15547670> >.

- 143 TÖGEL, F. et al. Bioluminescence imaging to monitor the in vivo distribution of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 295, n. 1, p. F315-21, Jul 2008. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18480180> >.
- 144 DUFFIELD, J. S. et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. **J Clin Invest**, v. 115, n. 7, p. 1743-55, Jul 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007251> >.
- 145 HUMPHREYS, B. D. et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 3, p. 284-91, Mar 2008. ISSN 1875-9777. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18371453> >.
- 146 HUMPHREYS, B. D.; BONVENTRE, J. V. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. **Annu Rev Med**, v. 59, p. 311-25, 2008. ISSN 0066-4219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914926> >.
- 147 SCHOREY, J. S.; BHATNAGAR, S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. **Traffic**, v. 9, n. 6, p. 871-81, Jun 2008. ISSN 1600-0854. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18331451> >.
- 148 ALMEIDA DC, B. E., ORIGASSA CST, OLIVEIRA CD, SEMEDO P, SILVA RC, MORAES MR, CENEDEZE MA, GLORIA MA, HIYANE MI, LONGO BM, SILVA AP, CÂMARA NOS. **Adipose-derived mesenchymal stem cells exhibit a renoprotective effect by modulation of global miRNA profile and microvesicles secretion** 2012.
- 149 CANTALUPPI, V. et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. **Kidney Int**, v. 82, n. 4, p. 412-27, Aug 2012. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22495296> >.
- 150 RATAJCZAK, J. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. **Leukemia**, v. 20, n. 5, p. 847-56, May 2006. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16453000> >.
- 151 DEREGBUS, M. C. et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2440-8, Oct 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17536014> >.
- 152 KIM, S. Y.; LEE, Y. H.; BAE, Y. S. miR-186, miR-216b, miR-337-3p, and miR-760 cooperatively induce cellular senescence by targeting α subunit of protein kinase CKII

- in human colorectal cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, Nov 2012. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23137536> >.
- 153 CAMUSSI, G. et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. **Kidney Int**, v. 78, n. 9, p. 838-48, Nov 2010. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703216> >.
- 154 ARMIÑÁN, A. et al. Mesenchymal stem cells provide better results than hematopoietic precursors for the treatment of myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v. 55, n. 20, p. 2244-53, May 2010. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466205> >.
- 155 ZOJA, C. et al. Mesenchymal stem cell therapy promotes renal repair by limiting glomerular podocyte and progenitor cell dysfunction in adriamycin-induced nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 303, n. 9, p. F1370-81, Nov 2012. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22952284> >.
- 156 LI, B. et al. Mobilized human hematopoietic stem/progenitor cells promote kidney repair after ischemia/reperfusion injury. **Circulation**, v. 121, n. 20, p. 2211-20, May 2010. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458011> >.
- 157 MORIGI, M. et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. **Stem Cells**, v. 26, n. 8, p. 2075-82, Aug 2008. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18499895> >.
- 158 _____. Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. **Stem Cells**, v. 28, n. 3, p. 513-22, Mar 2010. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20049901> >.
- 159 CHENG, K. et al. Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves cisplatin-induced renal injury through paracrine mechanisms. **Exp Mol Pathol**, v. 94, n. 3, p. 466-73, Jun 2013. ISSN 1096-0945. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23534987> >.
- 160 ELIOPOULOS, N. 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**, v. 299, n. 6, p. F1288-98, Dec 2010. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20844023> >.
- 161 LEE, P. Y. et al. Induced pluripotent stem cells without c-Myc attenuate acute kidney injury via downregulating the signaling of oxidative stress and inflammation in

ischemia-reperfusion rats. **Cell Transplant**, v. 21, n. 12, p. 2569-85, 2012. ISSN 1555-3892. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507855> >.

- 162 LEVI, B. et al. Studies in adipose-derived stromal cells: migration and participation in repair of cranial injury after systemic injection. **Plast Reconstr Surg**, v. 127, n. 3, p. 1130-40, Mar 2011. ISSN 1529-4242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364416> >.
- 163 BROXMEYER, H. E. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 10, p. 3828-32, May 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2566997> >.
- 164 GLUCKMAN, E. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **N Engl J Med**, v. 321, n. 17, p. 1174-8, Oct 1989. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2571931> >.
- 165 CUTLER, C.; BALLEEN, K. K. Improving outcomes in umbilical cord blood transplantation: State of the art. **Blood Rev**, Sep 2012. ISSN 1532-1681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22958984> >.
- 166 BALLEEN, K. K. et al. Collection and preservation of cord blood for personal use. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 14, n. 3, p. 356-63, Mar 2008. ISSN 1523-6536. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18275904> >.
- 167 ZUCCONI, E. et al. Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 715251, 2011. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785565> >.
- 168 ZHOU, Y. et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. **Stem Cell Res Ther**, v. 4, n. 2, p. 34, 2013. ISSN 1757-6512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23618405> >.
- 169 LANSDORP, P. M. Telomere length and proliferation potential of hematopoietic stem cells. **J Cell Sci**, v. 108 (Pt 1), p. 1-6, Jan 1995. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7738087> >.
- 170 HILLS, M. et al. Probing the mitotic history and developmental stage of hematopoietic cells using single telomere length analysis (STELA). **Blood**, v. 113, n. 23, p. 5765-75, Jun 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19359409> >.

- 171 JIN, H. J. et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 9, p. 17986-8001, 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24005862> >.
- 172 YANG, H. C. et al. Cells derived from young bone marrow alleviate renal aging. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 11, p. 2028-36, Nov 2011. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21965376> >.
- 173 SECCO, M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! **Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 146-50, Jan 2008. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932423> >.
- 174 IACONO, E. et al. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. **Reproduction**, v. 143, n. 4, p. 455-68, Apr 2012. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22274885> >.
- 175 BAKHSHI, T. et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. **Transfusion**, v. 48, n. 12, p. 2638-44, Dec 2008. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18798803> >.
- 176 S, A. et al. Mixed enzymatic-explant protocol for isolation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and encapsulation in 3D culture system **J. Biomedical Science and Engineering**, v. 5, p. 580-586, 2012.
- 177 HEMANN, M. T. et al. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. **Cell**, v. 107, n. 1, p. 67-77, Oct 2001. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595186> >.
- 178 CHERIF, H. et al. Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 5, p. 1576-83, Mar 2003. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12595567> >.
- 179 DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006. ISSN 1465-3249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606> >.
- 180 KIM, S. W. et al. Increased expression of ENaC subunits and increased apical targeting of AQP2 in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 289, n. 5, p. F957-68, Nov 2005. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956775> >.

- 181 DE ARAUJO, M. et al. Magnesium supplementation combined with N-acetylcysteine protects against postischemic acute renal failure. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, n. 11, p. 3339-49, Nov 2005. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177005> >.
- 182 GONG, H. et al. EPO and alpha-MSH prevent ischemia/reperfusion-induced down-regulation of AQPs and sodium transporters in rat kidney. **Kidney Int**, v. 66, n. 2, p. 683-95, Aug 2004. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15253723> >.
- 183 CONFORTI, A. et al. Microvesicles derived from mesenchymal stromal cells are not as effective as their cellular counterpart in the ability to modulate immune responses in vitro. **Stem Cells Dev**, v. 23, n. 21, p. 2591-9, Nov 2014. ISSN 1557-8534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24937591> >.
- 184 REIS, L. A. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repaired but did not prevent gentamicin-induced acute kidney injury through paracrine effects in rats. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44092, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22970165> >.
- 185 BRUNO, S. et al. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33115, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431999> >.
- 186 KILPINEN, L. et al. Extracellular membrane vesicles from umbilical cord blood-derived MSC protect against ischemic acute kidney injury, a feature that is lost after inflammatory conditioning. **J Extracell Vesicles**, v. 2, 2013. ISSN 2001-3078. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24349659> >.
- 187 BECKMAN, J. D. et al. Regulation of heme oxygenase-1 protein expression by miR-377 in combination with miR-217. **J Biol Chem**, v. 286, n. 5, p. 3194-202, Feb 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21106538> >.
- 188 FRANKEL, D.; MEHINDATE, K.; SCHIPPER, H. M. Role of heme oxygenase-1 in the regulation of manganese superoxide dismutase gene expression in oxidatively-challenged astroglia. **J Cell Physiol**, v. 185, n. 1, p. 80-6, Oct 2000. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942521> >.
- 189 CSONGRADI, E.; STORM, M. V.; STEC, D. E. Renal Inhibition of Heme Oxygenase-1 Increases Blood Pressure in Angiotensin II-Dependent Hypertension. **Int J Hypertens**, v. 2012, p. 497213, 2012. ISSN 2090-0392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22164328> >.

- 190 SÁENZ-MORALES, D. et al. Differential resolution of inflammation and recovery after renal ischemia-reperfusion injury in Brown Norway compared with Sprague Dawley rats. **Kidney Int**, v. 77, n. 9, p. 781-93, May 2010. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164827> >.
- 191 CHKHOTUA, A. B. et al. Influence of ischaemia/reperfusion and LFA-1 inhibition on telomere lengths and CDKI genes in ex vivo haemoperfusion of primate kidneys. **Transpl Int**, v. 17, n. 11, p. 692-8, Jan 2005. ISSN 0934-0874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15565356> >.
- 192 BRAUN, H. et al. Cellular senescence limits regenerative capacity and allograft survival. **J Am Soc Nephrol**, v. 23, n. 9, p. 1467-73, Sep 2012. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22797186> >.
- 193 YAN, J. et al. Obesity- and aging-induced excess of central transforming growth factor- β potentiates diabetic development via an RNA stress response. **Nat Med**, v. 20, n. 9, p. 1001-8, Sep 2014. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25086906> >.
- 194 TERASAKI, P. I.; CECKA, J. M.; GJERTSON, D. W. Impact analysis: a method for evaluating the impact of factors in clinical renal transplantation. **Clin Transpl**, p. 437-41, 1998. ISSN 0890-9016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10503121> >.
- 195 LI, X. X. et al. Klotho suppresses growth and invasion of colon cancer cells through inhibition of IGF1R-mediated PI3K/AKT pathway. **Int J Oncol**, v. 45, n. 2, p. 611-8, Aug 2014. ISSN 1791-2423. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24818842> >.
- 196 YSEBAERT, D. K. et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. **Nephrol Dial Transplant**, v. 15, n. 10, p. 1562-74, Oct 2000. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007823> >.
- 197 JO, S. K. et al. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, n. 5, p. 1231-9, May 2006. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410269> >.
- 198 KO, G. J. et al. Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. **Nephrol Dial Transplant**, v. 23, n. 3, p. 842-52, Mar 2008. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17984109> >.
- 199 ASCON, D. B. et al. Phenotypic and functional characterization of kidney-infiltrating lymphocytes in renal ischemia reperfusion injury. **J Immunol**, v. 177, n. 5, p. 3380-7,

- Sep 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920979> >.
- 200 STROO, I. et al. Chemokine expression in renal ischemia/reperfusion injury is most profound during the reparative phase. **Int Immunol**, v. 22, n. 6, p. 433-42, Jun 2010. ISSN 1460-2377. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20410256> >.
- 201 GANDOLFO, M. T. et al. Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. **Kidney Int**, v. 76, n. 7, p. 717-29, Oct 2009. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19625990> >.
- 202 JANG, H. R.; RABB, H. Immune cells in experimental acute kidney injury. **Nat Rev Nephrol**, Oct 2014. ISSN 1759-507X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25331787> >.
- 203 LEE, C. G. et al. Discovery of an integrative network of microRNAs and transcriptomics changes for acute kidney injury. **Kidney Int**, Apr 2014. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24759152> >.
- 204 SMIT-MCBRIDE, Z. et al. Age-dependent increase in miRNA-34a expression in the posterior pole of the mouse eye. **Mol Vis**, v. 20, p. 1569-78, 2014. ISSN 1090-0535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25489229> >.
- 205 KHEE, S. G.; YUSOF, Y. A.; MAKPOL, S. Expression of senescence-associated microRNAs and target genes in cellular aging and modulation by tocotrienol-rich fraction. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 725929, 2014. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25132913> >.

8. ANEXOS

8.1. Pôsteres relacionados ao estudo em questão, apresentados em congressos

A. Pôster apresentado na Semana do Rim, Kidney Week, promovida pela American Society of Nephrology (ASN) em 2012, em San Diego, Califórnia, EUA:

TH-PO064

Lineage-Negative Cord Blood (CB) Cells Protect against Ischemia/Reperfusion-Acute Kidney Injury (IR-AKI) in Rats Camila Eleuterio Rodrigues,¹ Ana C. de Bragança,¹ Mauro Shigueharu Oide Junior,¹ Enio Jose Bassi,² Niels O.S. Camara,² Antonio C. Seguro,¹ Lucia Andrade.¹

¹Nephrology, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, SP, Brazil; ²Immunology, University of Sao Paulo Biomedical Institute, Sao Paulo, SP, Brazil.

Background: IR-AKI induces cell-cycle inhibitors, including the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1), which is protective against AKI. However, it is known that critically short telomeres cause increased p21 expression, which increases the number of apoptotic renal cells. In telomerase-deficient mice, IR-AKI-induced impairment of renal function is more severe than in normal mice. Young stem cells can alleviate renal aging in mice and have less effect on p21 expression than do aged stem cells. The telomeres of CB stem cells are longer than are those of other stem cells. Although many stem cell types show potential as therapies for kidney diseases, uncultured lineage-negative CB cells (CBLin-) cells have never been tested in IR-AKI.

Methods: Blood was collected from healthy women and babies, and the mononuclear fraction was used for depletion of lineage-committed cells. Cell fluorescence was evaluated using a flow cytometer. Male Wistar rats were induced to IR by 45-min clamping of both renal arteries, and some rats received 10⁶ CBLin- cells (via tail vein) 6h after surgery. We studied three groups: control (C, n=8); IR (n=9); and IRLin- (n=6). After 48h of IR, we measured inulin clearance (Cin) and urinary volume. Immunoblotting for p21, eNOS and Klotho was performed in renal tissue. Data are mean±SEM.

Results: Selected cells were negative for CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD34, CD56, CD66b, CD73, CD90, CD 105, HLA-DR and glycophorin A.

Group	Cin (ml/min/100 g BW)	Urinary output (ml/h)	p21 expression (%)	eNOS expression (%)
C	0.94±0.05	0.56±0.13	97±7	87±8
IR	0.40±0.04 ^{ab}	1.04±0.22	179±16 ^{ab}	69±6 ^b
IRLin-	0.63±0.08 ^a	0.67±0.11	99±1	101±4

^ap<0.05 vs. C; ^bp<0.05 vs. IRLin-

Renal blood flow and mean arterial pressure did not differ among the groups. Klotho expression was dramatically decreased in IR rats and restored in IRLin- rats.

Conclusions: CBLin- cells could be used in treating IR-AKI. Further studies could identify the exact mechanism of their action.

FAPESP/CAPES/CNPq.

Funding: Government Support - Non-U.S.

B. Pôster apresentado no Congresso Brasileiro de Nefrologia em 2012, em São Paulo, SP, Brasil, ganhador de Menção Honrosa do Congresso:

Células linhagem-negativas de cordão umbilical humano protegem contra a lesão renal aguda (LRA) por isquemia/reperfusão (IR) em ratos

Camila Eleuterio Rodrigues^{*1}, Ana C. de Bragança¹, Mauro Shigueharu Oide junior¹, Ênio Jose Bassi², Niels O.S. Camara², Antônio C. Seguro¹ e Lúcia Andrade¹.

¹Nefrologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil e ²Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

Introdução

A LRA induzida por IR induz inibidores do ciclo celular, incluindo a proteína inibidora de quinase dependente de ciclinas p21 (WAF1/CIP1), que é protetora contra a LRA. Entretanto, sabe-se que telômeros criticamente curtos levam a aumento de expressão de p21, o que leva a aumento no número de células renais apoptóticas. Em camundongos deficientes em telomerase, a perda de função renal na LRA por IR é mais grave que em camundongos normais. Células-tronco jovens podem aliviar o envelhecimento renal em camundongos e têm menor ação na expressão de p21 que células-tronco idosas. Os telômeros das células-tronco provenientes de cordão umbilical são maiores do que os encontrados para outros tipos de células-tronco. Apesar de diversos tipos de células-tronco serem potenciais terapias para doenças renais, células de cordão umbilical linhagem negativa não colocadas em cultura (CTHLin-) nunca foram testadas em LRA por IR.

Métodos

Foi coletado sangue do cordão umbilical de mães e bebês saudáveis, e a fração mononuclear foi utilizada para depleção de células comprometidas com linhagens hematológicas. Marcadores celulares foram avaliados por citometria de fluxo. Ratos Wistar machos foram induzidos a IR por clampamento de artérias renais bilateralmente por 45 minutos, e alguns receberam 10⁶ CTHLin- (via veia caudal) 6h após a cirurgia. Foram estudados 3 grupos: controle (C, n=8); IR (n=9); e IRLin- (n=6). Após 48h da IR, foram aferidos depuração de inulina (Cin) e volume urinário. A expressão das proteínas p21, eNOS, Klotho e TGFβ foi avaliada em tecido renal por técnica de Western blotting. Dados em média ± erro padrão.

Resultados

As células selecionadas são negativas para CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD34, CD56, CD66b, CD73, CD90, CD 105, HLA-DR e glicoforina A.

Fluxo arterial renal e pressão arterial média não foram diferentes entre os grupos.

^ap<0.05 vs. C; ^bp<0.05 vs. IRLin-

Conclusão

CTHLin podem ser usadas no tratamento de LRA induzida por IR. Possivelmente o aumento na expressão de Klotho, com consequente inibição de TGFβ, aumento de p21 e possível redução de fibrose e apoptose intra-renais façam parte do mecanismo de proteção. Sua ação endotelial também deve ser melhor esclarecida. Mais estudos serão necessários para identificar seu mecanismo de ação exato e as consequências de sua utilização.

C. Pôster apresentado na Semana do Rim, Kidney Week, promovida pela American Society of Nephrology (ASN) em 2014, em Philadelphia, Pennsylvania, EUA:

TH-PO190

Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Acute Kidney Injury-Induced Renal Senescence

Camila Eleuterio Rodrigues, Jose Manuel Condor Capcha, Ana C. de Bragança, Maria H.M. Shimizu, Barbara A. Santana-Lemos, Danilo Candido Almeida, Niels O.S. Camara, Lucia Andrade. *Univ of Sao Paulo, Brazil.*

Background: Ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury (IR-AKI) induces kidney senescence, leading to cell-cycle arrest, telomere shortening and transient Klotho (Kl) deficiency. Although stem cells ameliorate renal injury, the effects might depend on their age. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) might better protect against IR-AKI.

Methods: We used flow cytometry to evaluate hUC-MSC phenotype. Male rats were induced to IR-AKI by 45-min clamping of both renal arteries; some rats received 10^6 hUC-MSC i.p. 6 h later. Rats were euthanatized on post-IR days 2 (D2) and 7 (D7). We studied four groups: IR-D2 (n=9); IR+MSC-D2 (n=5); IR-D7 (n=2); and IR+MSC-D7 (n=2). On D2, we measured creatinine clearance, fractional excretion of sodium (FENa) and FEK. In kidney tissue, we used Western blotting (for p21, Kl, TGF β and β galactosidase) and Southern blotting (for telomere length). Data are mean $\pm$ SEM.

Results: hUC-MSCs were negative for CD3, CD34, CD45 and HLA-DR, whereas they were positive for CD73, CD90 and CD105. Renal function was better in IR+MSC-D2 rats than in IR-D2 rats (0.22 ± 0.06 versus 0.1 ± 0.02 ml/min/100 g BW, $p<0.05$). FENa was lower in IR+MSC-D2 rats than in IR-D2 rats (0.73 ± 0.25 versus $2.85\pm1.12\%$, $p<0.05$), as was FEK (12.41 ± 3.96 versus $30.4\pm5.92\%$, $p<0.02$).

	IR-D2	IR+MSC-D2	IR-D7	IR+MSC-D7
p21, %	189.0 $\pm$ 4.3	117.5 $\pm$ 11.8 ^a	99.5 $\pm$ 1.5	99.5 $\pm$ 0.5
Kl, %	42 $\pm$ 4.0	73 $\pm$ 8.8 ^a	22.5 $\pm$ 2.5	67.5 $\pm$ 2.5 ^b
TGF β , %	168 $\pm$ 7.8	100 $\pm$ 13.5 ^a	99.5 $\pm$ 1.5	98.5 $\pm$ 0.5
β galactosidase, %	97.7 $\pm$ 1.4	97.3 $\pm$ 1.4	162 $\pm$ 1.4	96 $\pm$ 4.0

^a $p<0.05$ vs. IR-D2

^b $p<0.05$ vs. IR-D7

Telomeres length is shown.

Conclusions: hUC-MSCs improve renal function by preventing senescence. Supported by FAPESP.

Funding: Government Support - Non-U.S.

8.2. Produção científica

- D. Brainstem tumour mimicking pheochromocytoma. Melo NC, Carmo LP, Rodrigues CE, Marques ID, Praxedes JN. *J Hum Hypertens*. 2009 Jul;23(7):493-4. doi: 10.1038/jhh.2009.3.
- E. The potential role of C-reactive protein in distinguishing cytomegalovirus from tuberculosis and bacterial infections in renal transplant recipients. Costalonga EC, Melo NC, Rodrigues CE, Sette LH, Ianhez LE. *Clin Transplant*. 2009 Sep-Oct;23(5):710-5. doi: 10.1111/j.1399-0012.2009.01030.x.
- F. Tuberculosis-associated collapsing glomerulopathy: remission after treatment. Rodrigues CE, Sette LH, Torritani J, Malheiros DM, Titan SM, Barros RT, Woronik V. *Ren Fail*. 2010 Jan;32(1):143-6. doi: 10.3109/08860220903368567.
- G. A novel 60 kDa reactivity in cyclic neutropenia: high titer cytoplasmic ANCA immunostaining pattern and negative anti-proteinase-3 antibody. Rodrigues CE, Velloso ER, Pereira RM, Bonfá E, Teixeira FK, Bueno C, Dorlhiac-Laccer PE, Kondo AT, Viana VS, Carvalho JF. *Joint Bone Spine*. 2011 May;78(3):319-20. doi: 10.1016/j.jbspin.2010.10.001.
- H. Effects of continuous erythropoietin receptor activator in sepsis-induced acute kidney injury and multi-organ dysfunction. Rodrigues CE, Sanches TR, Volpini RA, Shimizu MH, Kuriki PS, Camara NO, Seguro AC, Andrade L. *PLoS One*. 2012;7(1):e29893. doi: 10.1371/journal.pone.0029893.
- I. Erythropoietin prevents sepsis-related acute kidney injury in rats by inhibiting NF- κ B and upregulating endothelial nitric oxide synthase. Souza AC, Volpini RA, Shimizu MH, Sanches TR, Camara NO, Semedo P, Rodrigues CE, Seguro AC, Andrade L. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Apr 15;302(8):F1045-54. doi: 10.1152/ajprenal.00148.2011.

RESEARCH LETTER

Brainstem tumour mimicking pheochromocytoma

Journal of Human Hypertension (2009) 23, 493–494;
 doi:10.1038/jhh.2009.3; published online 12 February 2009

The diagnosis of a catecholamine-secreting pheochromocytoma is always suggested by occurrence of severe and symptomatic paroxysmal hypertension. However, in most patients this diagnosis is not confirmed, despite extensive investigation.¹ Traditionally, besides pheochromocytoma, the differential diagnosis in cases of paroxysmal hypertension associated with catecholamine excess should include cocaine use, antiparkinsonian drugs, obstructive sleep apnoea and baroreflex failure.² Nonetheless, when the paroxysmal hypertension is associated not only with catecholamine excess, but also with neurologic signs, a very rare differential diagnosis should also be considered: a brainstem tumour mimicking pheochromocytoma.^{3–5}

We report a very unusual case of a 10-year-old boy who presented with a 2-month history of paroxysmal episodes of hypertension (up to 240 × 120 mmHg), tachycardia, palpitations and flushing. Between these episodes, he remained with resistant hypertension (blood pressure between 140 × 90 and 180 × 110 mmHg), despite regular use of high doses of enalapril (40 mg day⁻¹), amlodipine (20 mg day⁻¹), clonidine (0.4 mg day⁻¹) and hydrochlorothiazide (25 mg day⁻¹). Moreover, he was not taking antiparkinsonian drugs, cocaine or any other agent, besides the antihypertensive medication. Two weeks before admission, he presented with symptoms compatible with VI, VII, IX and X bilateral cranial nerves palsy, more intense at the left side. He also presented with left hemiparesis and cerebellar syndrome (broad-based gait, ataxia and dysmetria). Laboratory studies showed normal blood count and serum levels of sodium (141 mEq l⁻¹) and potassium (4.5 mEq l⁻¹); early morning serum cortisol (10.1 µg dl⁻¹), TSH (2.76 µU ml⁻¹) and C-reactive protein (0.93 mg l⁻¹) were within the normal range, as well as there was adequate renal function (serum creatinine = 0.4 mg dl⁻¹, estimated creatinine clearance = 160 ml min⁻¹). Urinalysis also had no abnormalities and urinary osmolality was within the normal range (492 mOsm kg⁻¹). However, there was a catecholamine excess in the 24-h urine collected (normetanephrine = 1123 mcg per 24 h, normal range = 105–354 mcg per 24 h; total metanephrine = 1563 mcg per 24 h, normal value < 1000 mcg per 24 h). Magnetic resonance of abdomen/pelvis/

thorax/neck failed to show any image that could suggest pheochromocytoma. In the same manner, scintigraphy using 123-I-MIBG failed to detect pheochromocytoma. Brain computed tomography scan showed no abnormality except for a very mild dilatation of the supratentorial ventricles. On the other hand, brain magnetic resonance imaging showed an unresectable brainstem tumour, compatible with low-grade glioma, infiltrating the whole medulla oblongata, as well as the cerebral and cerebellar peduncles and adjacent cerebellar parenchyma (Figure 1). After the diagnosis of the brainstem tumour, he was submitted to radiotherapy, with partial improvement of cranial nerves palsy and left hemiparesis, and better blood pressure control (levels between 120 × 80 and 140 × 90 mmHg, with the same antihypertensive agents used before treatment).

Mechanisms responsible for arterial hypertension in brainstem tumours include: raised intracranial pressure, increased catecholamine production and direct stimulation of the cardiovascular centre. In the only two other cases reported regarding brainstem tumours and hypertension, the cranial nerves were affected majorly on the left side, as also

Figure 1 Sagittal T1 weighted magnetic resonance imaging showing an infiltrative brainstem tumour, compatible with low-grade glioma (arrow). The brainstem tumour infiltrates the whole medulla oblongata, part of the cerebral and cerebellar peduncles and the adjacent cerebellar parenchyma.

The potential role of C-reactive protein in distinguishing cytomegalovirus from tuberculosis and bacterial infections in renal transplant recipients

Costalonga EC, Melo NCV, Rodrigues CE, Sette LHBC, Ianhez LE. The potential role of C-reactive protein in distinguishing cytomegalovirus from tuberculosis and bacterial infections in renal transplant recipients. Clin Transplant 2009; 23: 710–715. © 2009 John Wiley & Sons A/S.

Abstract: Introduction: The delay in the diagnosis of infections can be deleterious in renal transplant recipients. Thus, laboratory tests leading to an earlier diagnosis are very useful for these patients.

Purpose: To assess the behavior of C-reactive protein (CRP) in renal transplant recipients with a diagnosis of cytomegalovirus (CMV) infection, tuberculosis (TB) and bacterial infection (BI).

Methods: A retrospective analysis of 129 patients admitted at our hospital, from 2006 to 2008 because of CMV, TB or BI, was carried out. Appropriate statistical analysis was done and values were expressed as medians, range. Results: When CRP levels were compared among the groups with CMV disease, TB or BI, the group with CMV disease presented lower levels of CRP (18.4 mg/L, 0.28–44 mg/L) than the TB and BI ($p < 0.05$) groups.

The area under the receiver-operating characteristics curve, distinguishing CMV disease from TB/BI, was 0.96 ($p < 0.0001$), resulting in 100% sensitivity and 90.63% specificity to detect CMV disease when CRP < 44.5 mg/L. The subgroup analysis of CMV infection showed increasing levels of CRP (0.28, 16 and 29.5 mg/L) in the asymptomatic, symptomatic and invasive disease subgroups, respectively ($p < 0.05$).

Conclusion: The measurement of CRP levels may be a useful tool for differentiating CMV infection from the other types (bacterial or TB) of infection in kidney transplant recipients.

Elerson C. Costalonga, Natália C.V. Melo, Camilla E. Rodrigues, Luis H.B.C. Sette and Luiz E. Ianhez

Renal Transplant Unit, Urological Division and Renal Division, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Key words: C-reactive protein – cytomegalovirus – infection – inflammation – renal transplantation

Corresponding author: Natália Cordeiro Melo, Hospital das Clínicas da FMUSP, Disciplina de Nefrologia, Av. Dr. Enssi de Carvalho Aguiar, 255, 7º andar, São Paulo – SP 05403-900, Brazil.
Tel.: +55 11 30696000; fax: +55 11 30697883;
e-mail: nataliamelo@gmail.com

Accepted for publication 18 May 2009

Infectious complications are important causes of morbidity and mortality in renal transplant recipients. The clinical manifestations are varied and a delayed diagnosis, caused by the waiting time for microbiological tests to be performed, can be deleterious to the patient's evolution. Thus, examinations that allow an earlier diagnosis are very useful.

The C-reactive protein (CRP) is an acute-phase reaction protein synthesized by the liver, mainly in response to IL-6, which increases when an inflam-

matory process is present (1). Several methods have been developed to measure its levels in blood, such as enzyme immunoassay, rapid immunodiffusion, visual agglutination, immunoturbidimetry and immunonephelometry; the latter is broadly used, being both accurate and reproducible (2–4).

Over the last decades, several studies have supported the capacity of the CRP in helping with the differential diagnosis among the causes of systemic inflammatory response syndrome. A recent meta-analysis has reinforced the considerable

CASE REPORT

Tuberculosis-Associated Collapsing Glomerulopathy: Remission after Treatment

Camila E. Rodrigues, Luis H.B.C. Sette, and Juliana Torritani

Nephrology Division of University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

Denise M.A.C. Malheiros

Pathology Division of University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

Silvia M. Titas, Rui T. Barros, and Viktoria Woronik

Nephrology Division of University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

Collapsing glomerulopathy (CG) is a severe form of nephrotic syndrome and has been mostly associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection. Treatment response is poor, and the disease frequently leads to end-stage renal disease. More recently, CG has been described in association with other conditions, such as drug exposure and other infections, but renal prognosis remains unfavorable. This paper reports an interesting case of an HIV-negative patient with tuberculosis-related CG who needed dialysis for five months but presented full renal recovery after tuberculosis (TB) treatment and corticotherapy.

Keywords: collapsing glomerulopathy, tuberculosis, nephrotic syndrome, remission, dialysis

INTRODUCTION

Collapsing glomerulopathy (CG) was first described in 1986^[1] as a severe form of focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS), characterized by intense nephrotic syndrome and rapid loss of renal function. Its report in the literature is recently increasing, and it can be responsible for up to 20% of all idiopathic FSGS.^[2] Initially, it was described in association with human immunodeficiency virus (HIV) infection, but it is currently known that CG can occur in association with several other conditions,

such as drug exposure, virus infections, and auto-immune diseases.^[3,4] Although *Mycobacterium tuberculosis* infection is very prevalent in developing countries, so far only one case of CG associated with tuberculosis has been described. In this case, despite TB treatment and immunosuppressive schemes, the patient did not recover from the nephrotic syndrome and progressed to chronic renal failure.^[5] We instead report here on a case of successful treatment of TB-associated CG.

CASE REPORT

A 61-year-old Caucasian man was admitted to an emergency room due to hemoptitic expectoration, dyspnea, and fever occurring for the last 20 days. He also reported progressive edema and foamy urine in the previous 10 days. He had a history of untreated hypertension, alcohol addiction, and smoking. He did not use any current medication, and there was no exposure to potentially nephrotoxic drugs. His physical examination revealed important anasarca, blood pressure of 160 × 90 mmHg, normal pulse, and tachypnea. His pulmonary examination demonstrated crackling sounds in median right hemithorax, with no cardiac abnormalities. Ascites was preeminent. Chest radiography and CT scan demonstrated consolidated right superior lung lobe and signs of congestion. Three samples of sputum and broncho-alveolar lavage material were all negative for alcohol-acid resistant bacilloscopy. A clinical diagnosis of pneumonia was made, and the patient was started on antibiotics. His plasma glucose was normal, and anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody

Received 27 July 2009; accepted 24 August 2009.
Address correspondence to Camila E. Rodrigues, R. João Moura, 680, ap 94, São Paulo, Brazil, 05412-001; Tel: 55-11-23096531; Fax: 55-11-30698087; E-mail: camila_eleuterio@yahoo.com.br

Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

Letters to the editor

A novel 60kDa reactivity in cyclic neutropenia: High titer cytoplasmic ANCA immunostaining pattern and negative anti-proteinase-3 antibody

Keywords:

ANCA
Cyclic neutropenia
Neutropenia
G-CSF
Piggyback
Autoantibodies

Neutropenia, as defined conditions in which neutrophils counts were reported below as $1.5 \times 10^9/\text{mL}$, is a relatively common hematological disorder that may be associated with autoimmune diseases [1]. Antibodies to neutrophils have been observed in rheumatic disorders and their interaction with target antigens in these clinical conditions may have pathogenic consequences resulting in neutropenia [2]. Conversely, antineutrophil autoantibodies directed to cytoplasmic antigens (ANCA) which are closely related to systemic primary vasculitis, are usually accompanied by high leukocytes count [3]. No study evaluating ANCA in chronic neutropenia associated with onco-hematological conditions was already performed. Then, the objective of the present study is to assess the presence of ANCA in patients with chronic neutropenia related to a variety of hematological diseases.

A transversal study that included 23 patients with neutropenia-related to hematological disorders (10 aplastic anemia, 2 cyclic neutropenia, 1 myelodysplastic syndrome, 1 auto immune pancytopenia and 8 chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate-induced neutropenia) and under granulocyte-colony stimulating factor treatment for neutropenia followed up at Out-patient Hematology Clinic of our hospital. Exclusion criteria were drug use that induces ANCA such as propylthiouracil, methimazole, hydralazine, sulfasalazine, allopurinol, penicillamine, minocycline, chlorpromazine, methyldopa, hydralazine, procainamide, isoniazid, diltiazem or quinidine. All patients presented neutropenia $<1.5 \times 10^9/\text{L}$ for six months. All patients were clinically evaluated for differential diagnosis for vasculitis or other diseases ANCA-related were also excluded at first evaluation. ANCA was detected by indirect immunofluorescence and ELISA (INOVA, Diagnostics Inc., San Diego, CA) [4]. Antigenic specificity of ANCA was performed by immunoblotting using crude extract of human neutrophils.

Mean age was 49 years, 63.6% female and mean disease duration of 38 months. Median of neutrophils was $0.98 (0-1.7) \times 10^9/\text{L}$. Only two (9.1%) patients, both with cyclic neutropenia, presented positive ANCA at inclusion as tested by indirect immunofluorescence on ethanol-fixed human neutrophils (Fig. 1). Subjects, one man, 38-years-old, and one woman, 53-years-old, had cyclic neutropenia without familiar history. High reactivity was observed in these patients with titer of 1/1260 and $>1/2520$. Both patients had

Fig. 1. Indirect immunofluorescence showing cytoplasmic ANCA pattern in the two cyclic neutropenia patients.

negative results on ELISA for anti-PR3 and anti-MPO antibodies. Immunoblot analysis of sera from these two patients revealed a common reactivity to a neutrophil protein fraction with molecular weight of 60 kDa (Fig. 2) that was not recognized by the remaining 20 patients ANCA negative on IIF. Longitudinal serologic evaluation of these two patients through a period of four years showed consistently high titer c-ANCA reactivity and negative result for anti-PR3 antibody. Moreover, both patients had positive c-ANCA before G-CSF treatment. None of these two patients developed during this period signals and symptoms compatible with systemic vasculitis, except that one of them developed proliferation of large granular lymphocytes and is still well using cyclosporine A and G-CSF.

Our data showed that although classic cytoplasmic ANCA immunostaining pattern was observed in those two patients with cyclic neutropenia, these antibodies demonstrated no specificity to PR3. The putative pathogenic consequence on neutropenia of the binding of c-ANCA to the newly identified protein fraction of neutrophil deserves, however, further studies. Cyclic neutropenia is a rare hematologic disorder recognized by characteristic cycli-

Fig. 2. Reactivity patterns of serum samples from patients with cyclic neutropenia to crude extract of human PMN by immunoblotting on 12% gel. Lanes a and b: sera from patients with c-ANCA-like pattern by indirect IIF on human PMN and anti-PR3 negative by ELISA; Lane c: normal human serum; Lanes d and e: sera from patients ANCA negative by IIF on human PMN.

Effects of Continuous Erythropoietin Receptor Activator in Sepsis-Induced Acute Kidney Injury and Multi-Organ Dysfunction

Camila E. Rodrigues^{1*}, Talita R. Sanches¹, Rildo A. Volpini¹, Maria H. M. Shimizu¹, Patrícia S. Kuriki², Niels O. S. Camara^{2,3}, Antonio C. Seguro¹, Lúcia Andrade¹

¹ Department of Nephrology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Department of Nephrology, Paulista School of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³ Department of Immunology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Background: Despite advances in supportive care, sepsis-related mortality remains high, especially in patients with acute kidney injury (AKI). Erythropoietin can protect organs against ischemia and sepsis. This effect has been linked to activation of intracellular survival pathways, although the mechanism remains unclear. Continuous erythropoietin receptor activator (CERA) is an erythropoietin with a unique pharmacologic profile and long half-life. We hypothesized that pretreatment with CERA would be renoprotective in the cecal ligation and puncture (CLP) model of sepsis-induced AKI.

Methods: Rats were randomized into three groups: control; CLP; and CLP+CERA (5 µg/kg body weight, i.p., administered 24 h before CLP). At 24 hours after CLP, we measured creatinine clearance, biochemical variables, and hemodynamic parameters. In kidney tissue, we performed immunoblotting—to quantify expression of the Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2), aquaporin 2 (AQP2), Toll-like receptor 4 (TLR4), erythropoietin receptor (EpoR), and nuclear factor kappa B (NF-κB)—and immunohistochemical staining for CD68 (macrophage infiltration). Plasma interleukin (IL)-2, IL-1β, IL-6, IL-10, interferon gamma, and tumor necrosis factor alpha were measured by multiplex detection.

Results: Pretreatment with CERA preserved creatinine clearance and tubular function, as well as the expression of NKCC2 and AQP2. In addition, CERA maintained plasma lactate at normal levels, as well as preserving plasma levels of transaminases and lactate dehydrogenase. Renal expression of TLR4 and NF-κB was lower in CLP+CERA rats than in CLP rats ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), as were CD68-positive cell counts ($p < 0.01$), whereas renal EpoR expression was higher ($p < 0.05$). Plasma levels of all measured cytokines were lower in CLP+CERA rats than in CLP rats.

Conclusion: CERA protects against sepsis-induced AKI. This protective effect is, in part, attributable to suppression of the inflammatory response.

Citation: Rodrigues CE, Sanches TR, Volpini RA, Shimizu MHM, Kuriki PS, et al. (2012) Effects of Continuous Erythropoietin Receptor Activator in Sepsis-Induced Acute Kidney Injury and Multi-Organ Dysfunction. PLoS ONE 7(1): e30893. doi:10.1371/journal.pone.0030893

Editor: Steve Ram Singh, National Cancer Institute Staff Scientist Mouse Cancer Genetics Program, United States of America

Received: November 9, 2011; **Accepted:** December 6, 2011; **Published:** January 3, 2012

Copyright: © 2012 Rodrigues 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: The paper was supported, in part, by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo Research Foundation - www.fapesp.org and the Laboratório de Investigação Médica (LIM), Medical Investigation Laboratories of the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), University of São Paulo School of Medicine - www.fmed.usp.br. Hospital dos Clínicos, as well as by a grant from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CNPq), Office for the Advancement of Higher Education - www.cnpq.gov.br to CTS and by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, National Council for Scientific and Technological Development - www.cnpq.gov.br to TRS, ACS and LA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Niels Osmar Camara serves as an editor for PLoS ONE.

* Email: camila@ueroi.usp.br

Introduction

Severe sepsis leads to organ failure and is therefore associated with high mortality. Organ dysfunction is an independent prognostic factor for intensive care unit (ICU) mortality [1–3], which is highest among patients with hepatic dysfunction [4]. In patients with sepsis and concomitant acute kidney injury (AKI), ICU mortality can be as high as 70% [5]. Approximately 50% of all patients with sepsis develop AKI, which is also an independent predictor of 3-year mortality [5–7]. Various pathophysiological mechanisms have been proposed to explain sepsis-induced AKI [1]: vasodilation-induced glomerular hypoperfusion; dysregulated

circulation within the peritubular capillary network; tubular dysfunction induced by oxidative stress; and inflammatory reactions by systemic cytokine storm or local cytokine production. In mice, a lack of anti-inflammatory proteins, such as netrin-1, has been shown to elevate renal and systemic inflammatory markers, as well as enhancing ischemia and reperfusion kidney dysfunction; in such mice, treatment with netrin-1 has been found to restore a normal phenotype during AKI [8].

Toll-like receptors (TLRs) are the major microbial pathogen receptors on innate immune cells and have been identified in various organs, including the kidney. In the kidneys of animals with sepsis, there is marked upregulation of TLR4 [9], which is

Erythropoietin prevents sepsis-related acute kidney injury in rats by inhibiting NF- κ B and upregulating endothelial nitric oxide synthase

Ana Carolina C. Pessoa de Souza,^{1,*} Rildo A. Volpini,^{1,*} Maria Heloisa Shimizu,¹ Talita Rojas Sanchez,¹ Niels Olsen Saraiva Camara,^{2,3} Patricia Semedo,^{2,3} Camila Eleutério Rodrigues,¹ Antonio Carlos Seguro,¹ and Lúcia Andrade¹

¹Nephrology Department, University of São Paulo School of Medicine, ²Nephrology Department, Federal University of São Paulo, and ³Immunology Department, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Submitted 15 March 2011; accepted in final form 8 January 2012

de Souza ACCP, Volpini RA, Shimizu MH, Sanchez TR, Camara NOS, Semedo P, Rodrigues CE, Seguro AC, Andrade L. Erythropoietin prevents sepsis-related acute kidney injury in rats by inhibiting nuclear factor- κ B and upregulating endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F1045–F1054, 2012. First published January 11, 2012; doi:10.1152/ajprenal.00148.2011.—The pathophysiology of sepsis involves complex cytokine and inflammatory mediator networks, a mechanism to which NF- κ B activation is central. Downregulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) contributes to sepsis-induced endothelial dysfunction. Erythropoietin (EPO) has emerged as a major tissue-protective cytokine in the setting of stress. We investigated the role of EPO in sepsis-related acute kidney injury using a cecal ligation and puncture (CLP) model. Wistar rats were divided into three primary groups: control (sham-operated); CLP; and CLP+EPO. EPO (4,000 IU/kg body wt ip) was administered 24 and 1 h before CLP. Another group of rats received *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) simultaneously with EPO administration (CLP+EPO+L-NAME). A fifth group (CLP+EPO+treat) received EPO at 1 and 4 h after CLP. At 48 h postprocedure, CLP+EPO rats presented significantly higher inulin clearance than did CLP and CLP+EPO+L-NAME rats; hematocrit levels, mean arterial pressure, and metabolic balance remained unchanged in the CLP+EPO rats; and inulin clearance was significantly higher in CLP+EPO-treated rats than in CLP rats. At 48 h after CLP, creatinine clearance was significantly higher in the CLP+EPO rats than in the CLP rats. In renal tissue, pre-CLP EPO administration prevented the sepsis-induced increase in macrophage infiltration, as well as preserving eNOS expression, EPO receptor (EpoR) expression, IKK- α activation, NF- κ B activation, and inflammatory cytokine levels, thereby increasing survival. We conclude that this protection, which appears to be dependent on EpoR activation and on eNOS expression, is attributable, in part, to inhibition of the inflammatory response via NF- κ B downregulation.

THE MORTALITY RATES OF SEPSIS and septic shock remain unacceptably high and have not changed in several decades (5, 6, 26, 30). Acute kidney injury (AKI) occurs in ~50% of patients with sepsis (5, 30). In such patients, the development of AKI is predictive of a poor outcome, and the consequent mortality has been reported to be as high as 70% (5). Despite improved strategies for supporting vital organs and resuscitating patients, the incidence and mortality rates of septic AKI remain quite

high (5, 6). The prevention of kidney injury in intensive care settings continues to represent a great challenge.

It has been shown that NF- κ B mediates the transcription of a large number of genes, the products of which are known to play important roles in septic pathophysiology (24, 31). Mice deficient in those NF- κ B-dependent genes are resistant to the development of septic shock and to sepsis-related mortality (31). More importantly, blockade of the NF- κ B pathway corrects septic abnormalities. In sepsis, inhibition of NF- κ B activation restores systemic hypotension, ameliorates myocardial dysfunction, corrects vascular derangement, inhibits multiple proinflammatory gene expression, diminishes intravascular coagulation, reduces tissue neutrophil influx, and prevents microvascular endothelial leakage (31). Therefore, NF- κ B activation plays a central role in the pathophysiology of septic shock (31, 36).

Studies have indicated that downregulation of vascular endothelial nitric oxide synthase (eNOS) contributes to vascular hyporesponsiveness in sepsis (51). In animals submitted to cecal ligation and puncture (CLP), it has been shown that there is a significantly reduction in the extent of the eNOS-immunoreactive positive area in endothelial cells (51). In the CLP model, the decreased eNOS in vascular endothelial cells is at least partially responsible for endothelial cell dysfunction (52). In addition, Ckless et al. (9) suggest that arginase regulates NF- κ B via nitric oxide (NO)-dependent redox changes. These findings have implications for the pathophysiology of chronic inflammatory conditions (9).

Erythropoietin (EPO) is a growth hormone, and its principal physiological function is the induction of erythropoiesis. For the last two decades, EPO has been used in the management of anemia associated with end-stage renal disease (18). Recent studies have shown that, in addition to its hematopoietic activity, EPO has a cytoprotective effect on many different types of cells and tissues (4, 41). There are EPO receptors (EpoRs) widely distributed throughout a number of tissue types (48). The discovery that EpoRs are expressed in glomerular, mesangial, and tubular epithelial cells in human, rat, and mouse kidneys have prompted studies of the effects of EPO in small-rodent models of AKI (41, 44). Such studies have shown that EPO not only stimulates erythropoiesis but also has anti-inflammatory properties, as well as exerting the following effects (7, 19, 21, 38): reducing apoptosis, oxidative stress, and lipid peroxidation; promoting renal tubular cell regeneration, vascular regeneration, and neovascularization; mobilizing endothelial progenitor cells; and upregulating eNOS expression. It is also known that EPO mediates neuroprotection against axonopathy and apoptosis in the peripheral nervous system by

*A. C. C. Pessoa de Souza and R. A. Volpini contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: L. Andrade, Nephrology Dept., Univ. of São Paulo School of Medicine, Av. Dr. Arnaldo, 455, 5^o andar, sala 3310, CEP 05246-903, São Paulo, Brazil (e-mail: luciaa@usp.br).

http://www.ajprenal.org

1931-857X/12 Copyright © 2012 the American Physiological Society

F1045

9. APOIO FINANCEIRO

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do projeto de pesquisa número 2010/19012-0, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio de concessão de bolsa de doutorado do Programa de Excelência Acadêmica (Proex).