

MARINA PEREIRA CLARO MAIRES

Análise dos efeitos renoprotetores da inoculação subcapsular de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo em um modelo experimental de doença renal crônica pré-estabelecida

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camilla Fanelli

São Paulo

2021

MARINA PEREIRA CLARO MAIRES

Análise dos efeitos renoprotetores da inoculação subcapsular de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo em um modelo experimental de doença renal crônica pré-estabelecida

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camilla Fanelli

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Maires, Marina Pereira Claro

Análise dos efeitos renoprotetores da inoculação
subcapsular de células tronco mesenquimais
derivadas de tecido adiposo em um modelo
experimental de doença renal crônica pré-estabelecida
/ Marina Pereira Claro Maires. -- São Paulo, 2021.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Camilla Fanelli.

Descritores: 1.Células tronco mesenquimais de
tecido adiposo 2.Insuficiência renal crônica
3.Nefropatia experimental 4.Inoculação renal
subcapsular 5.Losartan

USP/FM/DBD-193/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, meu maior exemplo de força, fé e resiliência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof.^a Dra. Irene Noronha, pela oportunidade de realizar este trabalho no Lim 29, tenho grande admiração pela senhora e pelo seu trabalho como médica, pesquisadora e professora

Agradeço a minha orientadora, Prof.^a Dra. Camilla Fanelli, pela oportunidade de ser sua aluna, por compartilhar comigo todo o seu tempo e conhecimento. Admiro muito a sua trajetória e serei eternamente grata por você acreditar em mim

Agradeço a minha amada mãe, por me incentivar a percorrer este e tantos outros caminhos, agradeço por sua dedicação e amor incondicionais e por ser este exemplo de força, alegria e fé

Agradeço ao meu marido Carlos, por estar sempre meu lado, me dando força e tornando cada momento mais leve e feliz. Obrigada por sua companhia e por sua paciência

Agradeço ao meu irmão André, por todo apoio e incentivo e a minha irmã e melhor amiga Tânia, por toda amizade e parceria de sempre e por sempre acreditar em mim, por me ouvir e aconselhar

Obrigada aos meus sogros Elisabeth e Carlos, ao meu cunhado Eduardo e a minha cunhada Thalita, pelo apoio e por compreenderem gentilmente tantos momentos de ausência

Obrigada a minha querida amiga Patrícia, pelas conversas e momentos de alegria.

Á Dra. Samirah, por toda ajuda, incentivo e por todo o carinho de sempre.

Agradeço a Margoth e a Marcia, por serem sempre tão atenciosas e gentis comigo, a cada dúvida esclarecida ou ajuda concedida.

Á Cleonice, ao Wagner á Ivone, e a Luzia, do Lim 16, por toda ajuda e por serem sempre tão solícitos e gentis.

Obrigada aos colegas Marcos, Debora, Anne, Krisley, Kin, Victor, Lia, Paloma e José, este trabalho não seria possível sem a grande contribuição de vocês, sou muito grata a todos.

Agradeço ao Dr Sérgio e sua equipe do Lim 12, por toda a imensa gentileza com a qual me recebeu inúmeras vezes e por ter nos cedido o seu laboratório e os seus equipamentos sempre que necessário, tornando assim, tantas etapas possíveis

Obrigada a Priscila e a Rita por me ensinarem tanto sobre a Cultura de células, sempre de maneira delicada e doce, eu aprendi muito com vocês.

Aos colegas do Lim 29, Felipe, Lucas Andreza e Felipe Elias, obrigada por toda a ajuda e por todos os momentos e risadas compartilhados.

Obrigada a minha querida amiga Jessica, por toda a amizade, por tudo que você me ensinou tão gentilmente e pelas maravilhosas conversas, você certamente estará para sempre no meu coração.

Á minha amiga Mirtes, por toda ajuda e carinho e por todas as conversas e risadas.

Á Fapesp, pelo apoio financeiro.

E agradeço a Deus, por me amparar e me acompanhar a cada obstáculo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Obtenção do modelo experimental de ablação renal de 5/6 (Nx).....	27
3.2. Obtenção das células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo.....	27
3.3. Inoculação Subcapsular das CTmTA.....	31
3.4. Grupos Experimentais.....	31
3.5. Protocolo Experimental.....	33
3.6. Análises Histológicas.....	34
3.6.1. Reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS).....	34
3.6.2. Reação do Tricrômico de Masson.....	35
3.7. Análises Imuno-histoquímicas.....	35
3.8. Análises de Expressão Gênica por RT-qPCR.....	39
3.8.1. Isolamento e Purificação do RNA.....	39
3.8.2. Transcrição Reversa (RT).....	41
3.8.3. qPCR.....	42
3.9. Análises Estatísticas.....	42
3.10. Ensaio de Migração Celular.....	42
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Peso Corpóreo.....	46
4.2. Pressão Sistólica Caudal.....	48
4.3. Volume Urinário.....	50
4.4. Proteinúria.....	52
4.5. Albuminúria.....	55
4.6. Sobrevida.....	58
4.7. Creatinina Sérica.....	60
4.8. Clearance de Creatinina.....	61
4.9. Ureia Sérica.....	62

4.10.	Hipertrofia Renal.....	63
4.11.	Esclerose Glomerular.....	64
4.12.	Fibrose Intersticial.....	66
4.13.	Infiltração Intersticial de Miofibroblastos.....	68
4.14.	Infiltração Macrofágica Intersticial.....	70
4.15.	Infiltração Linfocitária Intersticial.....	72
4.16.	Proliferação Celular.....	74
4.17.	Expressão da Proteína ZO1.....	76
4.18.	Análises de Expressão Gênica.....	78
4.18.1.	IL-1β.....	78
4.18.2.	IL-2.....	79
4.18.3.	IL-4.....	80
4.18.4.	IL-6.....	81
4.18.5.	IL-10.....	82
5.	DISCUSSÃO.....	86
6.	CONCLUSÕES.....	100
7.	APÊNDICE.....	101
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

Lista de Abreviaturas e Símbolos

mL	Mililitros
g	Gramas
Kg	Quilos
mg	Miligramas
IP	Injeção intraperitoneal
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µm	Micrometros
mM	Milimolar
cels/mm ²	Células por milímetro quadrado
ng	Nanograma
mg/24hs	Miligramas por 24 horas
Δ	Delta
%	Porcentagem
mg/dL	Miligramas por decilitro
mL/min/357cm ²	Miligramas por minuto por 357 centímetros quadrados
g/dL	Gramas por decilitro
mmHg	Milímetros de Mercúrio

Lista de Figuras

Figura 1	Análise dos marcadores celulares de CTm realizada por citometria de fluxo.	29
Figura 2	Resultado dos ensaios funcionais do potencial de diferenciação celular em três linhagens de células tronco mesenquimais	30
Figura 3	Esquema ilustrativo do protocolo experimental e respectivos grupos	32
Figura 4	Eletroforese em gel de agarose para verificação das bandas de RNA e gDNA	40
Figura 5	Esfregaço de 2×10^6 CTmTA marcadas com DAPI, observadas ao microscópio de fluorescência	43
Figura 6	Desenho Experimental do Ensaio de Migração Celular	44
Figura 7	Visualização das CTmTA marcadas com DAPI 24h (A) e 15d (B) após a inoculação, que ocorreu após 15d de ablação renal de 5/6	45
Figura 8	Evolução ponderal dos animais ao longo do período de estudo	46
Figura 9	Peso corpóreo (g) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	47
Figura 10	Pressão sistólica caudal (mmHg) dos animais ao longo do período de estudo	48
Figura 11	Pressão sistólica caudal (mmHg) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	49
Figura 12	Volume urinário (mL) dos animais ao longo do período de estudo	50
Figura 13	Volume urinário (ml) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	51
Figura 14	Proteinúria (mg/24h) dos animais dos ao longo do período de estudo	52
Figura 15	Δ Proteinúria após 30 dias de ablação renal de 5/6	53
Figura 16	Proteinúria (mg/24 h) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	54
Figura 17	Albuminúria (mg/24h) dos animais ao longo do período de estudo	55
Figura 18	Δ Albuminúria após 30 dias de ablação renal de 5/6	56

Figura 19	Albuminúria (mg/24 h) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	57
Figura 20	Sobrevida dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	59
Figura 21	Creatinina sérica (mg/dL) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	60
Figura 22	Clearance de Creatinina sérica (mg/dL) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	61
Figura 23	Ureia sérica (mg/dL) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	62
Figura 24	Hipertrofia renal dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	63
Figura 25	Microfotografias ilustrativas de lâminas coradas pela reação de PAS para avaliação de glomerulosclerose	64
Figura 26	Porcentagem de Glomerulosclerose (%) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	65
Figura 27	Microfotografias ilustrativas de lâminas coradas pelo Tricrômico de Masson para avaliação de fibrose intersticial	66
Figura 28	Porcentagem de Fibrose Intersticial (%) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	67
Figura 29	Microfotografias ilustrativas de lâminas de Imuno-histoquímica para detecção de α -SMA	68
Figura 30	Porcentagem de α -SMA (%) Intersticial dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	69
Figura 31	Microfotografias ilustrativas de lâminas de Imuno-histoquímica para detecção de macrófagos	70
Figura 32	Infiltração Macrofágica Intersticial (céls/mm ²) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	71
Figura 33	Microfotografias ilustrativas de lâminas de Imuno-histoquímica para detecção de linfócitos	72
Figura 34	Infiltração Linfocitária Intersticial (céls/mm ²) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	73
Figura 35	Microfotografias ilustrativas de lâminas de Imuno-histoquímica para avaliação da Proliferação Celular	74

Figura 36	Proliferação de células intersticiais (céls/mm ²) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	75
Figura 37	Microfotografias ilustrativas de lâminas de Imuno-histoquímica para detecção de ZO1 nos glomérulos renais	76
Figura 38	Porcentagem de área glomerular ocupada por ZO1 (%) após 30 dias de ablação renal de 5/6	77
Figura 39	Expressão gênica de IL-1 β dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	78
Figura 40	Expressão gênica de IL-2 dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	79
Figura 41	Expressão gênica de IL-4 dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	80
Figura 42	Expressão gênica de IL-6 dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	81
Figura 43	Expressão gênica de IL-10 dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6	82

Lista de Tabelas

Tabela 1	Genes e sequência de primers	42
Tabela 2	Parâmetros de acompanhamento sistêmicos e renais dos animais dos diferentes grupos no tempo zero, após 15 e 30 dias da indução da DRC	83
Tabela 3	Parâmetros analisados ao final do estudo: Após 30 dias da indução da DRC	84
Tabela 4	Análise da Expressão gênica de mediadores pró e anti-inflamatórios	85

Lista de Siglas

DRC	Doença Renal Crônica
pmp	Pacientes por milhão
MEC	Matriz extracelular
SRRA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
All	Angiotensina II
BRAT-1	Bloqueadores dos receptores AT-1
LOS	Losartan
IECA	Inibidores da enzima conversora da All
TSR	Terapias de substituição renal
CTm	Células tronco mesenquimais
CTmMO	Células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea
Nx	Modelo animal de ablação renal de 5/6
CTmh	Células tronco mesenquimais humanas
IRA	Insuficiência renal aguda
CTmTA	Células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
IFN- γ	Interferon-gama
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
ICSCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Sham	Falso - Grupo controle
IM	Intramusculares
PC	Peso corpóreo
PSC	Pressão sistólica caudal
Creat	Creatinina
VoU	Volume urinário
PtnU	Proteinúria
AlbU	Albuminúria
PAS	Reação do Ácido Periódico de Schiff
GS	Glomérulosclerose

INT	Intersticial
α -SMA	α -Smooth Muscle Actin (Proteína α -actina de Músculo Liso)
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
ZO-1	Zônula de oclusão 1
TBS	Tris buffer saline
BSA	Solução de albumina de soro bovino
ON	<i>Over Night</i>
Dab	Diaminobenzidine, Dab Chromogen
<i>RT-PCR</i>	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
RPM	Rotação por minuto
rRNA	RNA ribossomal
gDNA	DNA genômico
cDNA	DNA complementar
Bact	Beta-actina
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
UV	Ultravioleta
AT1-R	Receptor AT1
Th0	linfócitos T auxiliares de perfil Th0
Th1	linfócitos T auxiliares de perfil Th1
Th2	linfócitos T auxiliares de perfil Th2
Tregs	Linfócitos T reguladores
Foxp3	Fator de transcrição <i>forkhead box P3</i>
IL-2R	Receptor para Interleucina 2

Resumo

A prevalência da doença renal crônica (DRC) tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas. A ativação exacerbada do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), a reação inflamatória local, o acúmulo de matriz extracelular e a fibrose renal contribuem para a sua evolução. O controle da DRC limita-se atualmente ao emprego de drogas inibidoras do SRAA, diuréticos e fármacos antiinflamatórios, sendo estes últimos relacionados a efeitos colaterais que inviabilizam seu uso por períodos prolongados. Neste contexto, dados recentes têm demonstrado que a aplicação de células tronco mesenquimais (CTm) no tecido renal de animais submetidos à modelos experimentais de DRC, limita a inflamação local e retarda a fibrogênese renal. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos renoprotetores da aplicação subcapsular de 2×10^6 de CTm derivadas de tecido adiposo (CTmTA) em ratos Wistar submetidos ao modelo de ablação renal de 5/6, além de comparar os efeitos renoprotetores do tratamento com CTmTA à renoproteção obtida no mesmo modelo com a administração oral de Losartan e, verificar se a aplicação subcapsular de CTmTA, associada à terapia com Losartan, promoveria maior renoproteção em relação às respectivas monoterapias. O peso corpóreo dos animais foi monitorado semanalmente. Nos tempos zero, 15 e 30 dias, a pressão caudal foi aferida e a urina de 24 hs coletada para as análises de proteinúria e albuminúria. Aos 30 dias, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue e tecidos para análises bioquímicas, histológicas, imunohistoquímicas e moleculares. A associação dos tratamentos se mostrou mais eficaz em reduzir a pressão sistólica, a glomerulosclerose, a infiltração linfocitária e a proliferação celular intersticial, bem como em promover a normalização da infiltração macrófaga no tecido renal dos animais, além da significativa regressão da proteinúria e da albuminúria, quando comparada aos tratamentos com ambas as monoterapias. Neste grupo também foram observados efeitos notórios na expressão gênica de IL-2, IL-4 e IL-6. Nossos resultados nos permitem concluir que a inoculação subcapsular de CTmTA associada a administração de Losartan exerceu importante efeito renoprotetor nos animais, cujos efeitos benéficos devem-se possivelmente, ao papel imunomodulador e anti-inflamatório de fatores secretados por estas células, modulando a resposta imunológica local.

Descritores: Células tronco mesenquimais de tecido adiposo; Insuficiência renal crônica; Nefropatia experimental; Inoculação renal subcapsular; Losartan

Abstract

Maires MPC. Renoprotective effects analysis of the of mesenquimal stem cells subcapsular inoculation derived from adipose tissue in an experimental model of pre-established chronic kidney disease [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Global prevalence of chronic kidney disease (CKD) has increased considerably in the recent decades. Overactivity of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), associated to renal inflammation and fibrosis contribute to its evolution. Pharmacological control of CKD progression is currently limited to the use of RAAS-inhibitors, diuretics and, in a less extent, immunosuppressive drugs. It motivates the medical and scientific community to investigate new therapeutic approaches in order to detain renal function loss in CKD patients. In this context, recent experimental studies have shown the application of mesenchymal stem cells (mSC) to exert renoprotective effects in the renal tissue of animals submitted to experimental models of CKD. The aim of the present study was to evaluate the renoprotective effects of subcapsular application of 2×10^6 mSC derived from adipose tissue (ASC) in Wistar rats submitted to the 5/6 renal ablation model (Nx), after 15 days of the establishment of CKD, when the nephropathy was already severe. We also sought to verify whether ASC associated to Losartan, would promote greater renoprotection when compared to the respective monotherapies. The animals were followed until 30 days of Nx. Body weight and systolic blood pressure was monitored at zero, 15 and 30 days after CKD induction, when 24-hour urine samples were collected for proteinuria and albuminuria analysis. After 30 days of Nx, all animals were euthanized, blood and renal tissues samples were collected and biochemical, histological, immunohistochemical and gene expression analysis were performed. The combination of ASC and Losartan treatments was more effective than Losartan monotherapy in reducing systolic blood pressure, glomerulosclerosis, lymphocyte infiltration and interstitial cell proliferation, as well as promoted the complete normalization of proteinuria and albuminuria, and a significant reduction in renal macrophage infiltration. Additionally, the association also exert protective effects on the gene expression of interleukins 2, 4 and 6. Our results suggest that subcapsular inoculation of ASC associated to Losartan administration exerted an important renoprotective effect in animals, whose beneficial

effects are possibly due to the immunomodulatory and anti-inflammatory role of factors secreted by these cells, modulating the local immune response.

Descriptors: Adipose tissue; mesenchymal stem cells; Renal insufficiency, chronic; Experimental nephropathy; Subcapsular renal inoculation; Losartan.

1. INTRODUÇÃO

A prevalência de doença renal crônica (DRC) têm aumentado progressivamente, acompanhando o aumento da expectativa de vida da população mundial [1,2]. Em nosso país essa tendência também se mostra verdadeira. De acordo com os dados do censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia, o número total estimado de brasileiros em tratamento dialítico ao final do ano de 2019 foi de 139.691, representando um incremento de cerca de 665 novos pacientes por milhão de habitantes (pmp), com relação ao ano anterior [3].

Independentemente da etiologia do insulto renal inicial, a DRC cursa com alterações hemodinâmicas, elevação da pressão arterial glomerular e sistêmica, perda da seletividade da barreira de filtração glomerular, distúrbios hidroeletrólíticos, aumento dos níveis séricos de toxinas urêmicas, inflamação renal crônica, aumento da síntese de matriz extracelular (MEC) e fibrose renal, levando à falência do órgão [4,5].

Alguns dos fatores que contribuem para a progressão da lesão renal são; a ativação exacerbada do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), com consequente aumento dos efeitos biológicos da angiotensina II (AII); a ativação dos mecanismos de resposta imunológica inata e adaptativa, com produção de mediadores pró-inflamatórios, recrutamento de leucócitos e estresse oxidativo; e o aumento da síntese e deposição de proteínas de MEC, tais como α -actina, colágeno e fibronectina, levando ao desenvolvimento de fibrose [6-12].

Dentre as estratégias terapêuticas atualmente empregadas no tratamento conservador da DRC destacam-se as drogas inibidoras do SRAA, tais como: Bloqueadores dos receptores AT-1 da AII (BRAT-1), como o Losartan (LOS) e o Candesartan, e os inibidores da enzima conversora da AII (IECA), tais como o Captopril e o Enalapril. Sabidamente, a inibição das atividades biológicas da AII está diretamente relacionada à redução da hipertensão arterial glomerular e sistêmica, bem como à diminuição da proteinúria em pacientes portadores de DRC causada por diferentes etiologias [13,14,61].

O bloqueio do SRAA tem demonstrado também outros efeitos benéficos, não relacionados à redução da pressão arterial, em diferentes patologias. Em um estudo experimental utilizando um modelo de nefropatia diabética induzida por estreptozotocina, Telles e colaboradores demonstraram detalhadamente que o tratamento com LOS promoveu a regressão de lesões histológicas renais, tais como expansão mesangial e índice de esclerose glomerular, independentemente de seu efeito sobre a pressão arterial, evidenciando efeitos protetores diretos da inibição da AII [59]. O grupo de Wang e colaboradores, por sua vez, demonstrou que a administração de LOS suprime a resposta inflamatória na artrite experimental induzida por colágeno, através da redução da ativação das células T e B e da queda na produção de citocinas pró-inflamatórias [62].

Apesar da inibição farmacológica do SRAA ser largamente aplicada a mais de 25 anos no tratamento clínico das nefropatias, a mesma não é capaz de conter definitivamente a progressão da doença, nem mesmo promover a regressão permanente das lesões ocasionadas por ela. Em alguns casos, o bloqueio do SRAA pode ser associado ao uso de diuréticos e fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores, a depender da etiologia da doença de base do paciente. Contudo, até o presente momento não existe um arsenal terapêutico especificamente anti-fibrótico que seja eficaz e seguro para a completa contenção da progressão da DRC. Este fato motiva a comunidade médica e científica a desenvolver estudos em busca de alternativas terapêuticas eficazes para conter sua progressão e protelar a necessidade da aplicação de terapias de substituição renal (TSR) [13, 14].

Neste contexto, a aplicação terapêutica de células tronco mesenquimais (CTm) com a finalidade de conter a inflamação e retardar o processo de fibrose renal tem apresentado resultados promissores em estudos desenvolvidos com modelos experimentais de DRC. Conforme demonstrado por Cavaglieri et al., CTm derivadas de medula óssea (CTmMO) de ratos Wistar apresentam potencial renoprotetor no tratamento da DRC em modelo animal de ablação renal de 5/6 (Nx). Paralelamente, Noronha et al., demonstraram que CTm humanas (CTmh) derivadas do líquido amniótico também teriam um potencial renoprotetor neste mesmo modelo [15, 16].

De acordo com a literatura, as CTm apresentariam efeitos imunomoduladores capazes de lentificar a progressão ou tratar as complicações associadas aos processos fibróticos, não apenas nos rins, mas também em outros tecidos acometidos por afecções crônico-degenerativas, nas quais a inflamação e a cicatrização tecidual exercem um papel significativo [17-19]. Segundo Chen e colaboradores, CTmMO são capazes de promover o recrutamento de macrófagos e de células da linhagem endotelial, através de fatores parácrinos, melhorando a vascularização e, conseqüentemente, a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos [20].

Zhang e colaboradores observaram, através de estudos realizados com modelo murino de insuficiência renal aguda (IRA), induzida por isquemia / reperfusão, que CTm derivadas de tecido adiposo (CTmTA) apresentaram efeitos renoprotetores através de ação anti-inflamatória e anti-apoptótica [21]. A administração de CTmMO também se mostrou eficaz em reduzir a inflamação e a migração de miofibroblastos em um modelo murino de transplante de aorta, graças às propriedades imunomoduladoras destas células, conforme observado em estudo realizado por Santana e colaboradores [22].

Contradizendo o que se acreditava nos primórdios do surgimento das terapias experimentais com CTm, dados de estudos recentes tem demonstrado que os efeitos benéficos obtidos com a administração dessas células não estariam diretamente relacionados a mecanismos de transdiferenciação e substituição tecidual, mas a efeitos anti-inflamatórios de ação parácrina, envolvendo sinalização intercelular através de citocinas e interleucinas, bem como sinalização intracelular, através da modulação da atividade de receptores e fatores de transcrição [23-25]. Outros estudos sugerem ainda, que seriam proteínas e micro RNAs secretados pelas CTm quando estas são aplicadas em um tecido lesado, os maiores responsáveis pela modulação das vias inflamatórias, reparadoras, fibróticas e angiogênicas, levando à melhora da lesão [26].

Conforme observado por Aggarwal et al., em um elegante estudo *in vitro*, leucócitos mantidos em co-cultura com CTmMO tiveram sua secreção de citocinas alterada, desenvolvendo um perfil mais anti-inflamatório, à medida que passaram a secretar menores quantidades de mediadores como o Fator de Necrose Tumoral α

(TNF- α) e o Intérferon-gama (IFN- γ), e passaram a produzir maiores quantidades de Interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) [27]. Outros autores também constataram que a presença das CTmMO em cultura inibiu a proliferação, a secreção de citocinas e o potencial citotóxico dos linfócitos T CD8+, além de inibir a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, reduzindo sua capacidade de produzir anticorpos [28-30].

Definidas como uma população de células indiferenciadas, capazes de se auto renovar e de se diferenciar em vários tipos celulares, as CTm podem ser classificadas em embrionárias e adultas, sendo essas últimas bastante vantajosas em relação às embrionárias [31, 32]. Além de seu uso ser mais aceito do ponto de vista ético e religioso, as CTm adultas apresentam elevado potencial de diferenciação e facilidade de isolamento em laboratório [31-33]. Estas células também exibem um fenótipo hipoinmunogênico, uma vez que não possuem as principais moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*) de classe II e expressam apenas baixos níveis de MHC de classe I, o que lhes permite evitar o reconhecimento imunológico do hospedeiro e conseqüentemente, a rejeição [34].

Devido à ausência de um marcador específico para as CTm, em 2005 a *International Society for Cellular Therapy* – ICSTC determinou critérios mínimos para a caracterização das CTm. Assim, de acordo com estes critérios, independentemente da sua fonte de isolamento, as CTm devem ser aderentes ao plástico, ter potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, apresentar os marcadores de superfície celular: CD105, CD73 e CD90 e não apresentar os marcadores de superfície celular: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 e HLA-DR [35].

Segundo Caplan, a maioria, se não todas as CTm são de origem perivascular, desempenhando a função fisiológica de monitorar e reagir a sinais sistêmicos, tais como lesões ou infecções, através da produção e liberação de citocinas, em todos os tecidos vascularizados do corpo [36]. As células tronco adultas são caracterizadas conforme o local de onde foram isoladas, como por exemplo, as células tronco neurais, hematopoiéticas e as células tronco mesenquimais de tecido adiposo, que serão o foco do presente estudo. As CTmTA são uma população de células multipotentes

auto-renováveis presentes no estroma dos tecidos adiposos, onde desempenham um papel importante para o desenvolvimento, crescimento, manutenção e homeostase tecidual. Atuam também como repositório celular para o reparo e regeneração do tecido [34].

As CTmTA apresentam algumas vantagens em relação às CTm obtidas a partir de outras fontes. Em primeiro lugar, a retirada de amostras de tecido adiposo oferece baixo risco para os doadores e possibilita a obtenção de grande quantidade de tecido (100-1000 mL, através de lipoaspiração). Além disso o procedimento para a obtenção do tecido adiposo é mais barato, menos invasivo e menos doloroso quando comparado aos métodos de obtenção de CTm de medula óssea (CTmMO). Adicionalmente, o isolamento das CTmTA, bem como a manutenção dessas células em cultura, em laboratório é relativamente fácil, quando comparado ao isolamento e cultivo de CTm de outros tecidos adultos [37,38]. Graças a essas características a aplicação de CTmTA vem sendo atualmente introduzida em estudos piloto, na prática clínica [39 - 41].

De acordo com estudos realizados por Kunter e colaboradores, a administração de CTm por via endovenosa para o tratamento da DRC pode ser pouco eficaz, uma vez que apenas uma pequena porcentagem das células é capaz de alcançar o órgão de interesse e, assim exercer uma possível ação imunomoduladora [42]. A fim de se otimizar a permanência, por período prolongado, da quantidade desejada de células no local da lesão, a avaliação de vias alternativas de inoculação deve ser considerada. Desta forma, conforme demonstrado por Cavaglieri e colaboradores, a inoculação de CTm na região subcapsular renal é capaz de propiciar uma efetiva migração celular através do córtex do órgão, dos glomérulos e do interstício renal, apresentando maior eficácia na distribuição e permanência celular na região de interesse [43].

Com base no exposto, a hipótese geral do presente estudo é de que a aplicação de CTmTA no espaço subcapsular renal de ratos Wistar machos submetidos ao modelo de DRC induzido pela ablação renal cirúrgica de 5/6 da massa renal possa desacelerar a evolução do quadro inflamatório associado ao modelo e da concomitante fibrose renal que leva à perda progressiva da função, através de seus efeitos imunomoduladores. Caso essa hipótese seja confirmada, a aplicação de

CTmTA como tratamento adjuvante à terapia farmacológica atualmente empregada para o controle da DRC poderá representar uma alternativa para a contenção da fibrose renal que acompanha a doença.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi analisar o possível efeito renoprotetor da aplicação subcapsular de CTmTA em ratos Wistar machos submetidos ao modelo de DRC induzida pela ablação cirúrgica de 5/6 da massa renal (Nx).

A partir dessa pergunta central, tivemos como objetivos específicos:

- Analisar os efeitos da aplicação de CTmTA realizada 15 dias após a ablação renal, quando a DRC já está bem estabelecida, fazendo assim um melhor paralelo com as condições observadas na prática clínica.
- Comparar os efeitos renoprotetores do tratamento com CTmTA no modelo Nx à renoproteção obtida no mesmo modelo com a administração do BRAT-1 Losartan, uma das drogas comumente empregadas no tratamento clínico da DRC.
- Verificar se a aplicação subcapsular de CTmTA associada à terapia com Losartan promove maior renoproteção em relação às respectivas monoterapias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 79 ratos Wistar machos, obtidos de uma colônia estabelecida no biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O cálculo amostral para determinação do número de animais foi realizado considerando-se o índice de mortalidade de 20%, aceito para o modelo experimental utilizado, nos tempos estudados [14, 44].

Esses animais foram mantidos em temperatura ambiente de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 5\%$ e ciclo claro/escuro de 12/12h, tendo livre acesso à ração convencional para roedores (Nuvital, Brasil) e à água. Todos os experimentos previstos neste projeto foram analisados e aprovados pelo comitê de ética para a utilização de animais de experimentação da FMUSP (CEUA FMUSP, PROTOCOLO DE PESQUISA No 1019/2018).

3.1 Obtenção do modelo experimental de ablação renal de 5/6 (Nx)

Para obtenção do modelo Nx, 64 ratos Wistar machos com peso entre 220 e 280 g foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano (BioChimico, Brasil), tricotomia da região ventral e laparotomia mediana, sob assepsia. Realizamos a ligadura de 2 dos 3 ramos da artéria renal do rim esquerdo, promovendo o infarto de 2/3 da massa desse órgão. Por fim, o rim direito foi removido, obtendo-se assim a redução de 5/6 da massa renal total. Como controle utilizamos 11 animais submetidos a laparotomia mediana xifo-púbica, porém sem retirada de massa renal (Sham).

Após a cirurgia todos os animais receberam injeções intramusculares (IM) de antibiótico enrofloxacino (0,4 mL/Kg de Baytril injetável 5%, Bayer), em dose única e receberam também 3 doses de analgésico (5 mg/Kg de Tramadol), sendo uma dose a cada 24 horas. Os animais foram mantidos em gaiolas aquecidas até se recuperarem da anestesia.

3.2 Obtenção das células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

As células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTmTA) foram isoladas a partir do tecido adiposo subcutâneo gonadal de 4 ratos Wistar adultos

machos. Os animais foram eutanasiados por injeção intraperitoneal (IP) de dose letal de Tiopental (0,1 g/rato) e posteriormente tiveram o tecido adiposo subcutâneo gonadal removido, picado e digerido com solução de colagenase a 0,075% (Sigma-Aldrich, USA). Após centrifugação e processamento, as células obtidas foram ressuspensas em 10 mL de meio de cultura completo (DMEM-Low Glucose + 10%SFB + antibióticos) e plaqueadas em frascos para cultura de células, que foram mantidos em estufa úmida a 37°C, 5% de CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Marietta, EUA). As células foram mantidas em cultura, sendo monitoradas diariamente sob microscopia invertida. As trocas do meio de cultura foram realizadas três vezes por semana e as células foram tripsinizadas e replaqueadas sempre que atingiram confluência entre 60% e 80%.

Entre a 4^a e a 6^a passagem celular foi realizada a análise da viabilidade das células, utilizando-se a coloração de azul de trypan, seguida pela caracterização das populações celulares pelo método de citometria de fluxo, em que a presença de marcadores celulares específicos para CTm, tais como CD29, CD44, CD90 e CD105, bem como a ausência do marcador pan-leucocitário CD45 foi verificada empregando-se anticorpos monoclonais específicos. Os dados foram analisados no equipamento CELLQuest™ (Becton Dickinson, San Jose, CA EUA) efetuando-se para cada amostra uma aquisição de 10.000 eventos. Os resultados foram analisados na forma de histogramas e em percentual da população celular com reação positiva para cada anticorpo, caracterizando-se assim a população de CTmTA, conforme demonstrado na **Figura 1**. Adicionalmente foram realizados os testes de plasticidade celular, para verificar a capacidade de diferenciação das CTmTA nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, seguindo protocolos previamente padronizados neste e em outros laboratórios, conforme ilustrado na **Figura 2** [15,22,45]. As CTmTA foram incubadas em meios de diferenciação com 90 mL de STEMPRO® Osteocyte/Chondrocyte/Adipocyte Differentiation Basal Medium [1X]; 10 mL de STEMPRO® Osteogenesis/Chondrogenesis/Adipogenesis Supplement [1X] e 5 µg/mL de Gentamicina (10mM/mL), por 14 dias para as induções condrogênica e adipogênica e por 21 dias para a osteogênica. Os meios de diferenciação foram trocados 3 vezes por semana e, após a completa indução, a diferenciação osteogênica foi confirmada através do emprego da coloração de Vermelho de Alizarina que garantiu a visualização de cristais de cálcio; da coloração de Alcian blue

para confirmação da linhagem condrogênica através da visualização de polissacarídeos sulfatados e, por fim, a visualização de vacúolos de lipídios citoplasmáticos, observados graças a administração da coloração Oil-red, garantiu a confirmação da linhagem adipogênica.

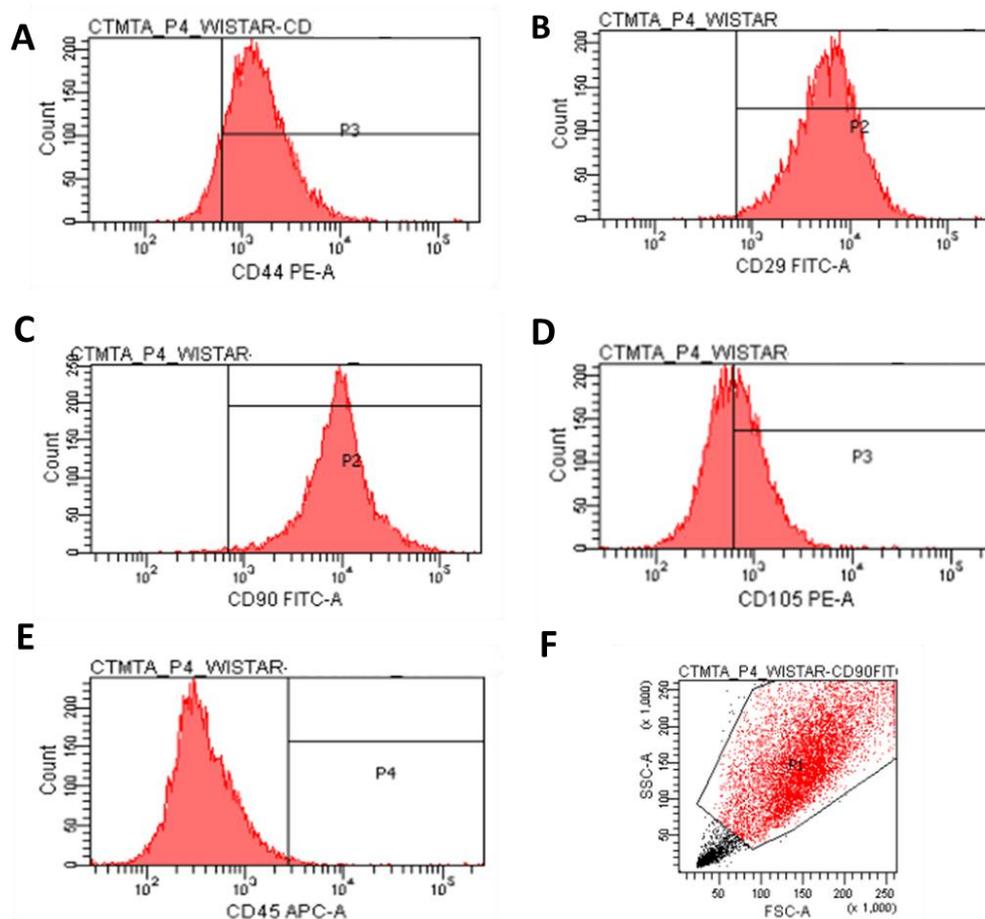


Figura 1: Análise dos marcadores celulares de CTm realizada por citometria de fluxo. População celular positiva para os marcadores típicos: CD44 (A), CD29 (B), CD90 (C) e CD105 (D) e negativa para o marcador CD45 (E). Foram analisados 10.000 eventos, dos quais 8.898 viáveis: P1 (F)

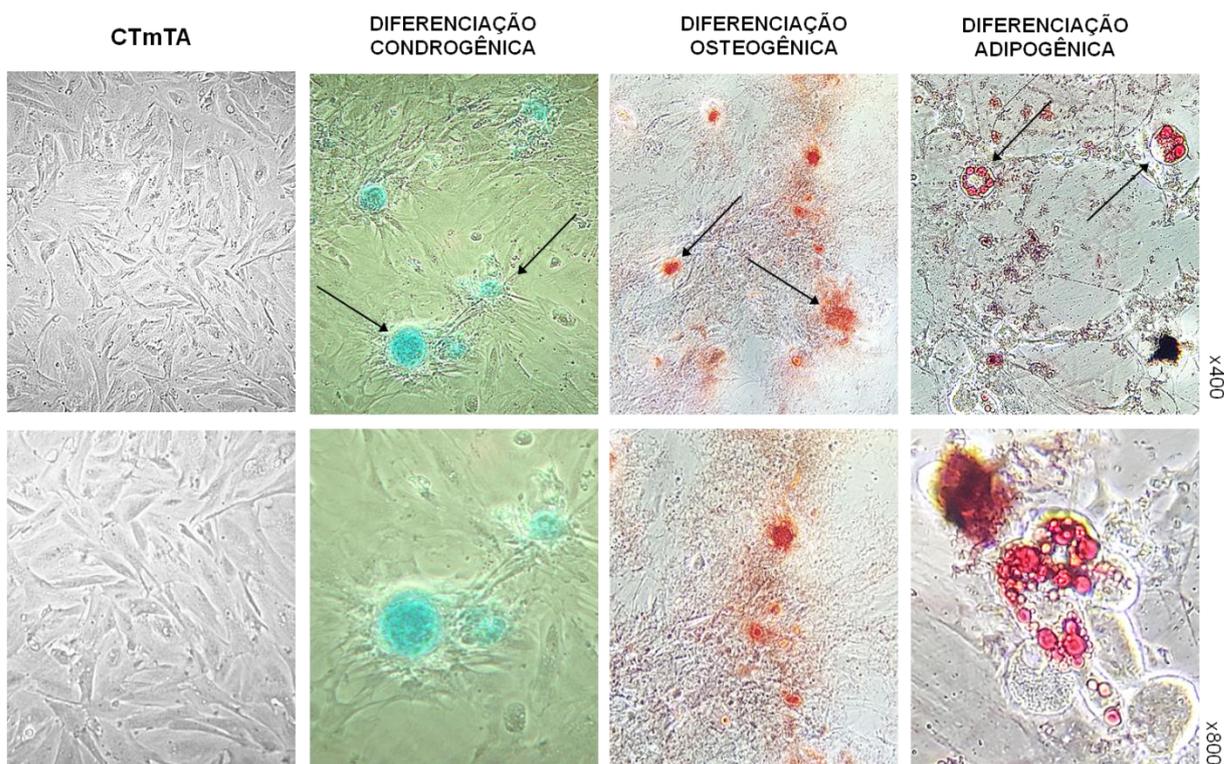


Figura 2: Resultado dos ensaios funcionais do potencial de diferenciação celular em três linhagens de células tronco mesenquimais, após três semanas em cultura, entre a 4^o e a 6^o passagem. A diferenciação adipogênica foi verificada através da presença de gotículas lipídicas coradas em vermelho através da coloração com Oil-red, a diferenciação osteogênica foi verificada por meio de cristais de cálcio avermelhados corados com Vermelho de Alizarina e, por fim, a diferenciação condrogênica foi evidenciada através da presença de proteoglicanos sulfatados da matriz, destacados na cor azul turquesa e corados com Alcian blue. CTmTA indiferenciadas também podem ser observadas. As fotos foram realizadas sob os aumentos de 400x e 800x.

3.3 Inoculação subcapsular das CTmTA

No presente estudo experimental, as CTmTA entre a 4^a e a 6^a passagem celular foram inoculadas nos animais Nx, 15 dias após a realização da cirurgia da ablação renal. Os ratos foram previamente anestesiados com isoflurano, submetidos à laparotomia e à injeção subcapsular de 10 µL de solução contendo 2×10^6 CTmTA ressuspendidas em PBS estéril (aplicação de CTmTA), ou somente PBS estéril (aplicação de veículo). Assim como na primeira cirurgia, após a realização da inoculação todos os animais receberam injeções IM de antibiótico enrofloxacino (0,4 mL/Kg de Baytril injetável 5%, Bayer), em dose única e 3 doses de analgésico (5 mg/Kg de Tramadol), sendo uma a cada 24 horas. Os animais foram mantidos em gaiolas aquecidas até sua completa recuperação.

3.4 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais, conforme descrição abaixo e, de acordo com o esquema ilustrativo da **Figura 3**:

- **Nx 15d**: Animais Nx acompanhados por 15 dias após a cirurgia de ablação renal. Esses animais foram utilizados como grupo pré-tratamento.
- **Nx 30d**: Animais Nx submetidos a cirurgia de ablação renal e acompanhados por 30 dias, sem tratamento.
- **Nx+CTmTA 30d**: Animais Nx submetidos à aplicação subcapsular de 2×10^6 CTmTA ressuspendidas em PBS estéril após 15 dias de ablação renal, como tratamento da DRC já estabelecida. Esses animais foram acompanhados até os 30 dias de Nx.
- **Nx+LOS 30d**: Animais Nx que receberam 50 mg/kg/dia de Losartan diluído na água do bebedouro, dos 15 aos 30 dias após a cirurgia de ablação renal. Esses animais foram acompanhados até os 30 dias de Nx.
- **Nx+CTmTA+LOS 30d**: Animais Nx submetidos a aplicação subcapsular de 2×10^6 CTmTA após 15 dias de ablação renal, quando também passaram a receber 50 mg/kg/dia de Losartan diluído na água do bebedouro. Esses animais foram acompanhados até os 30 dias de Nx.
- **Sham 30d**: Animais controle acompanhados por 30 dias após a cirurgia Sham.

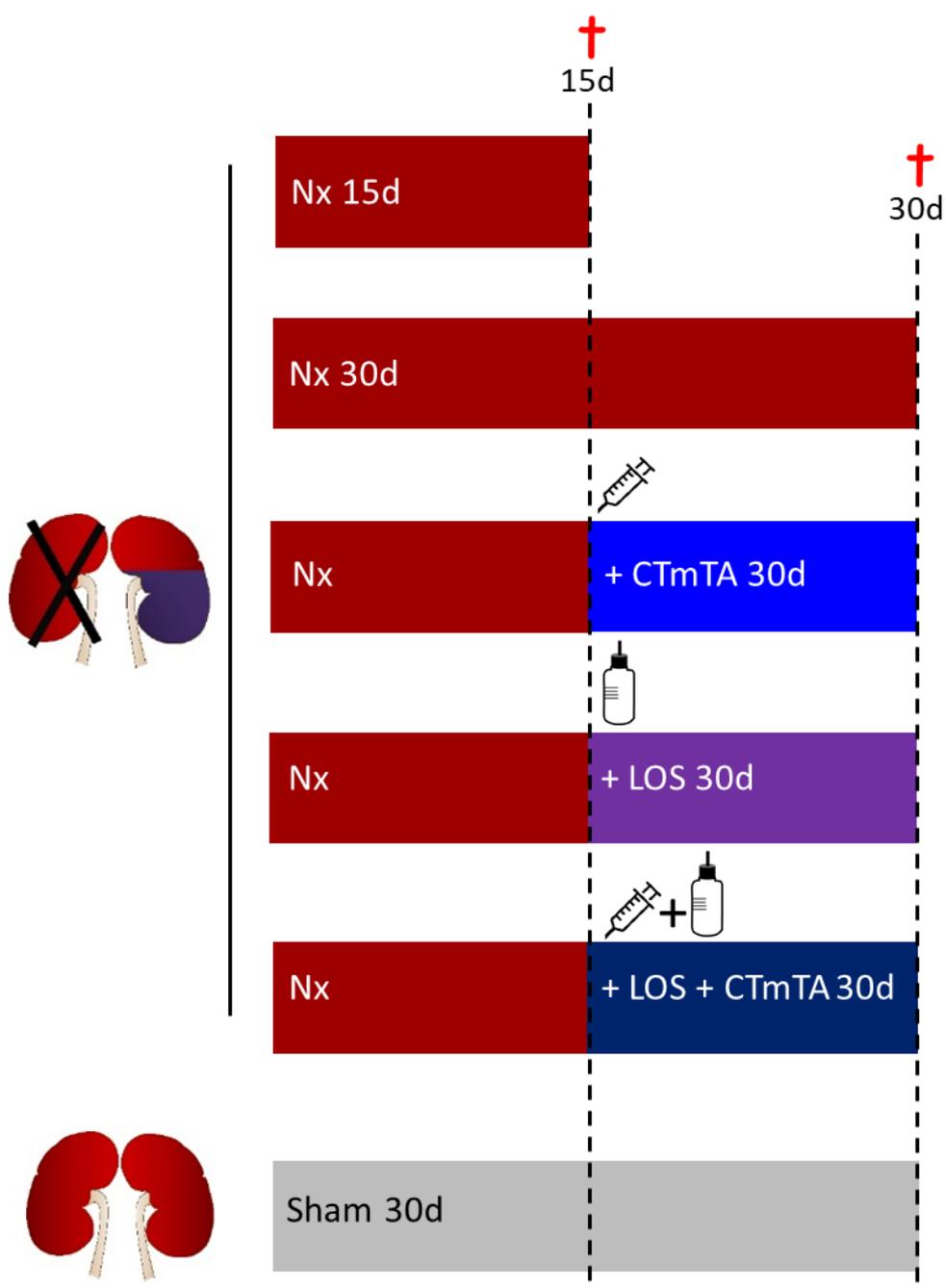


Figura 3: Esquema ilustrativo do protocolo experimental e respectivos grupos

3.5 Protocolo experimental

Todos os animais foram mantidos em condições adequadas de temperatura, umidade e iluminação, conforme mencionado anteriormente, e tiveram livre acesso à ração padrão para roedores durante todo o período de observação.

Os animais tiveram seu peso corpóreo (PC, g) monitorado semanalmente e sua pressão sistólica caudal (PSC, mmHg) aferida aos 0, 15 e 30 dias de estudo, quando também foram coletadas amostras de urina de 24 horas para verificação de alterações do volume urinário (VolU, mL), presença de proteinúria (PtnU, mg/24h) por análise colorimétrica (Kit Sensiprot, Labtest#36) e de albuminúria (AlbU, mg/24h), por imunodifusão radial, empregando-se anticorpo específico (anti-albumina de rato, MPBiomedicals LLC #55711, EUA) [46].

Ao final do período de estudo (15 ou 30 dias após a ablação renal), os animais foram novamente anestesiados com isoflurano e submetidos a uma laparotomia xifopúbica. A aorta abdominal foi puncionada e através dela foram coletadas amostras de sangue para dosagem de creatinina e ureia séricas empregando kits comercialmente disponíveis (Kit Creatinina #35 e Kit Ureia CE #27, Labtest, Brasil). A depuração de creatinina (Creat, mg/min) foi obtida medindo-se a concentração de creatinina urinária (creat urinária, mg/dL), com o mesmo kit colorimétrico, e realizando os seguintes cálculos: $[(\text{Creat urinária} \times \text{Volume urinário}) / \text{Creat.sérica}] / 1440$. Correções adicionais para a área de superfície corporal do rato ($\text{ASC} \cong 357 \text{ cm}^2$) foram obtidas dividindo este resultado por 0,0357 (Clearance de creat, mg / min / ASC).

O rim esquerdo foi retirado, pesado e fracionado, sendo metade fixada em solução Du Boscq-Brasil, por 30 minutos, seguido de fixação com paraformaldeído tamponado (pH: 7,4) por 24-72 horas, e a outra metade rapidamente congelada em nitrogênio líquido e posteriormente conservada em freezer a -80°C para a realização de análises de expressão gênica. Para a análise da hipertrofia renal, realizamos o seguinte cálculo = (peso do rim esquerdo / peso corpóreo) x 1000.

3.6 Análises histológicas

Os fragmentos renais fixados foram desidratados e diafanizados em um processador automático de tecidos (Leica TP1020) através de uma sequência de banhos em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 90% e 100%), seguidos por banhos de xilol e de parafina fundida a 60-65°C. Posteriormente, os tecidos foram incluídos em blocos de parafina e utilizados para a confecção das lâminas histológicas.

Os cortes histológicos na espessura de 4 μm foram confeccionados em micrótomo (Leica RM2245), montados sobre lâminas de vidro previamente silanizadas (3-Aminopropyltriethoxy-silane, Sigma #A3648) e deixados em estufa a 60°C por 2h para a fusão da parafina e adesão dos fragmentos às lâminas.

3.6.1 Reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS)

A reação do ácido periódico de Schiff (PAS) foi utilizada para a avaliação da esclerose glomerular através da contagem da porcentagem de glomérulos esclerosados (GS %) Para essa coloração, as lâminas contendo os cortes de tecido renal foram mantidas por 30 minutos em estufa a 60°C, desparafinizadas através de uma sequência de três banhos de xilol e reidratadas através uma bateria de banhos em concentrações decrescentes de álcool, sendo álcool 100% (2 banhos), álcool 96% (2 banhos), álcool 70%, respectivamente e, por fim, banhadas em água destilada. Após o processo de desparafinização e hidratação, as lâminas foram mantidas por 10 minutos em Ácido Periódico a 1%, sendo posteriormente lavadas em água corrente e mergulhadas no Reativo de Schiff, ao abrigo da luz, por 30 minutos. Após nova lavagem em água corrente, as lâminas foram então mergulhadas em solução de Hematoxilina de Carazzi por 5 minutos, ainda ao abrigo da luz. Por fim, os cortes foram lavados em água corrente e, após o processo de desidratação, (banhos com soluções de concentração crescentes de álcool e por fim xilol) as lamínulas foram coladas com cola histológica permanente.

As lâminas coradas pela reação de PAS foram submetidas à análise por um patologista, que avaliou 50 glomérulos de cada animal, sob aumento final de 400x. A

porcentagem de glomérulos esclerosados (GS %) foi avaliada sobre o total de glomérulos analisados.

3.6.2 Reação do Tricrômico de Masson

Para avaliação da porcentagem de fibrose renal intersticial (INT %) foi empregada a coloração histológica do Tricrômico de Masson. Para este fim, as lâminas contendo os cortes de tecido renal passaram pelo processo de desparafinização e hidratação previamente descritos e foram mergulhadas em solução de Hematoxilina Férrica de Weigert por 20 minutos. Sequencialmente, foram lavadas em água corrente e mergulhadas em solução de Escarlata de Bierbrich a 1%, por 10 minutos. Os cortes foram novamente lavados em água corrente e mergulhados em solução ácida fosfotúngica-fosfomolibdica (diferenciador) por 5 minutos. Nesta etapa, as lâminas passaram por mais uma lavagem em água corrente e foram mantidas em solução ácida de Azul de anilina por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram submetidos a uma última lavagem em água corrente, seguida de desidratação e montagem utilizando-se cola histológica permanente.

A fração intersticial do córtex renal ocupada por fibrose (corada positivamente pelo tricrômico de Masson) foi quantificada por um método de contagem de pontos. Foram avaliados 30 campos microscópicos consecutivos, em um aumento final de 200x, sob uma tela pontilhada contendo 160 pontos equidistantes, obtendo-se um valor final, expresso em porcentagem de fibrose intersticial [12, 14, 47].

3.7 Análises imuno-histoquímicas

A técnica de imuno-histoquímica foi empregada na detecção de marcadores de inflamação e fibrose renal, tais como: Infiltração do compartimento tubulointersticial por macrófagos, detectados através da positividade para o marcador de superfície CD68, por linfócitos, detectados através da positividade para o marcador de superfície CD3+, e por miofibroblastos, detectados pela presença da proteína α -actina de Músculo Liso (α -Smooth Muscle Actin - α SMA). Foram analisadas ainda, a proliferação celular no interstício renal, detectada pela positividade das células para o antígeno PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), presente no núcleo das células durante a fase S do ciclo celular. Por fim, utilizamos imunohistoquímica também para

a verificação da integridade da barreira de filtração glomerular, avaliada através da positividade glomerular para o marcador ZO-1 (zônula de oclusão 1), proteína constituinte da fenda diafragmática localizada entre as pedicelas podocitárias.

Após desparafinização, conforme descrito anteriormente, foi realizada a recuperação antigênica utilizando-se solução de Ácido Cítrico a 10 mM, tamponado a pH 6,0, em temperatura aproximada de 95°C em micro-ondas, por 15 minutos. As lâminas foram então resfriadas e posteriormente mergulhadas em solução tampão TBS (Tris buffer saline), pH 7,6. Os cortes foram delimitados com uma caneta hidrofóbica (PAP PEN) e todas as incubações foram realizadas em câmara úmida, protegida da luz, a fim de evitar o ressecamento dos cortes.

A identificação de macrófagos e miofibroblastos, foi realizada através da técnica de Imunofosfatase (Estreptavidina-Biotina Fosfatase Alcalina). Os cortes foram incubados com 50 µL de solução de AVIDINA para bloqueio por 15 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram lavadas em TBS, no shaker, por 5 minutos e novamente incubadas, agora com 50 µL de BIOTINA para bloqueio, por mais 15 minutos (Biotin Blocking Kit #BBK030, ScyTek Laboratories, USA). Na sequência, as lâminas foram novamente lavadas em TBS, por mais 5 minutos e os cortes foram então incubados com 50 µL de solução de bloqueio de marcação inespecífica (Super Block #AAA125, ScyTek Laboratories, USA) por 30 minutos.

Para a detecção de macrófagos, os tecidos foram incubados com 50 µL de solução de anticorpo primário *Monoclonal Mouse Anti-CD68 clone ED-1* (Serotec, #MCA341R), na diluição de [1:200] e para a identificação de miofibroblastos, os cortes foram incubados com 50 µL de solução de anticorpo primário *Monoclonal Mouse Anti α-SMA* (Sigma, #A2547), na diluição de [1:1000]. Os anticorpos foram diluídos em solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1% em TBS. As incubações foram realizadas em câmara úmida, na geladeira, a 4°C, e tiveram duração de 12-16 horas (*Over Night* - ON).

No dia seguinte as lâminas foram novamente lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas com 50 µL de solução de anticorpo secundário *Anti-mouse Biotinilado* (Vector #BA2001), diluído a [1:200] em BSA 1% em TBS, por 45 minutos.

Sequencialmente, os cortes foram lavados em TBS por 5 minutos e então incubadas em 50 μ L de solução do Complexo Estreptavidina-Biotina Fosfatase Alcalina (Vector #AK5000) por 30 minutos. Os tecidos foram novamente lavados e submetidos à revelação com solução a base de Fast Red (1,5-naphthalenedisulfonate salt, Fast Red TR Salt, Sigma-Aldrich # F6760), sob microscópio, por 5-10 minutos. As lâminas foram coradas com solução de Hematoxilina de Harrys a 50% por 30 segundos e, por fim, foram montadas com lamínulas coladas com glicergel.

A identificação de células intersticiais em proliferação foi realizada através da técnica de Imunoperoxidase (Estreptavidina-Biotina Peroxidase). Os cortes foram incubados com 50 μ L de solução de bloqueio de peroxidase endógena (Peroxidase Block #ACA015, ScyTek Laboratories, USA) e, em seguida, lavados por 5 minutos em TBS. As lâminas foram então submetidas aos bloqueios de biotina endógena e de marcação inespecífica, conforme mencionado anteriormente. Para a detecção de células em proliferação, os tecidos foram incubados com 50 μ L de solução de anticorpo primário *Monoclonal Mouse Anti-Human PCNA* (Dako, #M0879) diluído a [1:1000] em solução de BSA a 1% em TBS. Essa incubação foi realizada em câmara úmida, ON, a 4°C.

No dia seguinte as lâminas foram novamente lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas com 50 μ L de solução de anticorpo secundário *Anti-mouse Biotinilado* (Vector #BA2001), diluído a [1:200] em BSA 1% em TBS, por 45 minutos. Sequencialmente, os cortes foram lavados em TBS por 5 minutos e então incubadas em 50 μ L de solução do Complexo Estreptavidina-Biotina Peroxidase (Vector #PK4000) por 30 minutos. Os tecidos foram novamente lavados e submetidos à revelação com solução a base de Dab (Diaminobenzidine, Dab Chromogen + Substrate Kit #ACB030, ScyTek Laboratories, USA) sob microscópio, por 5-10 minutos. As lâminas foram coradas com solução de Hematoxilina de Harrys a 50% por 30 segundos e, por fim, foram montadas com lamínulas coladas com glicergel.

A identificação de linfócitos foi realizada através da técnica de Imunoperoxidase com polímero de amplificação. Os cortes foram incubados com 50 μ L de solução de bloqueio de marcação inespecífica (Super Block #AAA125, ScyTek Laboratories, USA) por 30 minutos e sequencialmente, com 50 μ L de solução de anticorpo primário

Anti-CD3 (DAKO #A4052) diluído a [1:1000] em solução de BSA a 1% em TBS, na proporção de [1:100]. Essa incubação foi realizada em câmara úmida, ON, a 4°C. No dia seguinte as lâminas foram novamente lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas com 50 µL de Polímero Rabbit+HRP (Spring #DHRR), por 30 minutos, em câmara úmida, a temperatura ambiente. Os tecidos foram novamente lavados e submetidos à revelação com solução a base de Dab (Diaminobenzidine, Dab Chromogen + Substrate Kit #ACB030, ScyTek Laboratories, USA) sob microscópio, por 5-10 minutos. As lâminas foram coradas com solução de Hematoxilina de Harrys a 50% por 1 minuto e, por fim, foram montadas com lamínulas coladas com glicergel.

A quantificação do infiltrado de macrófagos e linfócitos no tecido renal, bem como de células intersticiais em processo de proliferação foi realizada através da contagem de células positivas para CD68, CD3 e PCNA, respectivamente, em 25 campos microscópicos do córtex renal de cada animal, sob aumento final de 400x. Os resultados foram expressos em células/mm² (cels/mm²). Por sua vez, a quantificação da área do interstício renal ocupada por α -SMA foi realizada através do mesmo método de contagem de pontos usado na quantificação da área intersticial corada positivamente para o Tricrômico de Masson.

Por fim, a integridade da barreira de filtração glomerular foi verificada através da porcentagem da área glomerular ocupada pela proteína ZO-1, em 25 glomérulos, sob aumento final de 400x. Para este fim, foi realizada a técnica de Imunoperoxidase com polímero de amplificação. Após desparafinação convencional, os cortes foram lavados e incubados com 50 µL de solução de bloqueio de peroxidase endógena (Peroxidase Block #ACA015, ScyTek Laboratories, USA) por 30 minutos e, em seguida, lavados por 5 minutos em TBS. As lâminas foram então submetidas ao bloqueio de marcação inespecífica, por 30 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, os tecidos foram incubados com 50 µL de solução de anticorpo primário Anti-ZO-1 (ZYMED 617300) diluído a [1:50] em solução de BSA a 1% em TBS. Essa incubação foi realizada em câmara úmida, ON, a 4°C. No dia seguinte as lâminas foram novamente lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas com 50 µL de solução de Polímero Rabbit+HRP (Spring #DHRR), por 30 minutos. Por fim, os tecidos foram novamente lavados e submetidos à revelação com solução a base de Dab (Diaminobenzidine, Dab Chromogen + Substrate Kit #ACB030, ScyTek Laboratories,

USA) sob microscópio, por 5-10 minutos. As lâminas foram coradas com solução de Hematoxilina de Harrys a 50% por 30 segundos e, por fim, foram montadas com lamínulas coladas com glicergel.

3.8 Análises de Expressão Gênica por RT qPCR

A técnica de RT qPCR foi empregada para realização das análises quantitativas da expressão gênica de mediadores pró e anti-inflamatórios, como as citocinas e interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-4 e IL-6 e IL-10.

3.8.1 Isolamento e Purificação do RNA

O RNA total dos fragmentos renais previamente congelados em nitrogênio líquido a -80° C, foi extraído, empregando-se o reagente Trizol (Ambion Thermo Fischer #15596018). Fragmentos de tecido pesando entre 50 e 100 mg foram homogeneizados em 1 mL de Trizol com auxílio de um dispersador de tecidos (IKA Labortechnik Ultra Turrax T25 Junke & Kunkel,Staufen, Alemanha). Posteriormente, a cada 1 mL de homegenato, foram adicionados 200 μ L de Clorofórmio (Merk, Damstadt, Alemanha), seguido por homogeneização e centrifugação a 13.200 RPM, por 15 minutos, a temperatura ambiente até que se obtivessem três fases distintas: RNA total, DNA e proteínas, respectivamente. Em seguida, 500 μ L da fase incolor resultante da centrifugação, referente ao RNA total, foram isolados e homogeneizados com 500 μ L de Isopropanol gelado (Sigma Chemical Co,Sait Louis, EUA) e incubados por 10 minutos, a temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas a 13.200 RPM por 15 minutos, agora a 4°C, e o sobrenadante descartado cuidadosamente, obtendo-se assim, a visualização de um pequeno *pellet* de RNA ao qual foram adicionados 500 μ L de Etanol 70% (Merk, Damstadt, Alemanha), a -20° C, a fim de se ressuspender o *pellet*, seguido de posterior homogeneização. Este procedimento foi repetido mais uma vez e, por fim, os tubos permaneceram abertos na *workstation* por cerca de 60 minutos para secagem.

Após este período, foram adicionados aos tubos contendo o RNA total, 50 μ L de água RNase *free*. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e foram feitas alíquotas de 5 μ L para posterior leitura em Espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Marietta, EUA). Através da análise da absorbância dos

comprimentos de onda obtiveram-se os dados referentes a concentração ($\eta\text{g}/\mu\text{L}$) de RNA total nas amostras, bem como a constatação da pureza dos extratos, através da relação das absorbâncias em diferentes comprimentos de ondas, onde a medida primária para determinação da pureza do RNA total foi estabelecida através da relação A260/280 e cujo valor aceitável deveria ser igual ou maior que 1,9 e, a medida secundária para determinação da pureza do RNA total foi determinada por meio da relação A260/230 e cujo valor aceitável deveria ser igual ou maior a 2,0. Amostras com resultados fora deste intervalo foram descartadas.

As amostras de RNA total foram submetidas à verificação da integridade da molécula através de corrida eletroforética em gel de agarose, conforme ilustrado na **Figura 4**.

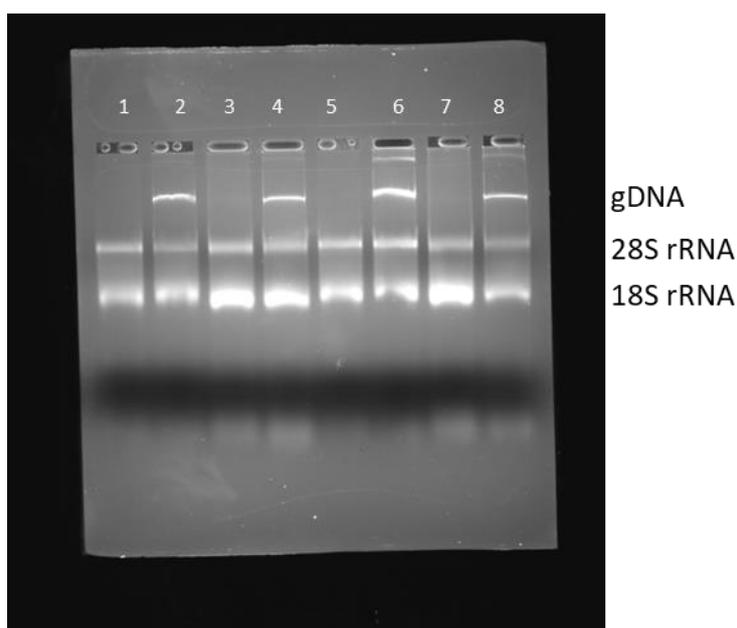


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose para verificação da integridade do RNA extraído. Podemos verificar a presença de duas bandas de rRNA:28S e 18S em todas as amostras, enquanto a presença de uma terceira banda, de intensidade mais branda e de peso molecular superior às bandas de RNA, pode ser observada apenas nas amostras n° 2, 4, 6 e 8, indicando contaminação por gDNA nestas amostras.

A integridade do RNA foi constatada pela observação da presença de duas bandas de RNA ribossomal (rRNA):18S e 28S, tendo a primeira, aproximadamente o dobro da intensidade da segunda e sendo a presença de arraste interpretada como

sinal de degradação do RNA, o que inviabilizaria a amostra. A presença de uma terceira banda de intensidade mais branda e de peso molecular superior às bandas de RNA, quando observada, foi interpretada como sinal de contaminação por DNA genômico (gDNA) e cuja presença foi eliminada através da etapa seguinte.

Para a eliminação do gDNA, à cada tubo destinado as amostras foram adicionados 6 μL do Mix GE do KIT Turbo DNase *free*TM (Invitrogen #AM1907) contendo 5 μL de Buffer Turbo DNase [10X] e 1 μL de enzima Turbo DNA-*free* TM (Invitrogen #AM1907). Em seguida, foi acrescentado o volume calculado de RNA correspondente a massa total de 10 μg de RNA e, por fim, o volume de água RNase *free* para completar o volume final de 50 μL de reação por tubo. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 30 minutos. Ao término do processo, foram acrescentados 5 μL do inativador de DNase do mesmo kit à cada tubo, e a seguir, as amostras foram homogeneizadas e mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos. Na sequência, as mesmas foram centrifugadas a 10.000 RPM por 2 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante (RNA total, livre de gDNA) foi submetido a nova leitura no Espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Marietta, EUA) para análise da integridade e concentração do RNA, conforme descrito anteriormente.

3.8.2 Transcrição Reversa (RT)

Após o isolamento do RNA, procedeu-se a transcrição reversa: A cada tubo contendo o volume de RNA previamente calculado para a massa total de 1 μg , foi adicionado 1 μL de Oligo-DT primer (Promega #C110A) [0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] e esta mistura foi incubada em Termociclador convencional por 5 minutos a 70°C. Ao término do aquecimento as amostras foram colocadas em gelo e homogeneizadas. A cada tubo foram adicionados 9 μL do MIX da reação de Transcrição Reversa, contendo 5 μL de Buffer (M-MLV RT Promega #M1705); 1,75 μL de água RNase *free*; 1,25 μL de dNTP Mix (Promega #U1515) e 1 μL de Enzima Transcriptase Reversa (M-MLV RT PROMEGA #M1750), seguido de homogeneização. Em seguida, as amostras foram incubadas novamente em termociclador convencional por 60 minutos a 42°C obtendo-se assim, aproximadamente 20 μL de cDNA (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), que foi mantido a -20°C até o momento da realização das análises de PCR.

3.8.3 qPCR

As análises de qPCR em tempo real foram realizadas no equipamento *Step One Plus – Applied Biosystemetems - Life Technologies* empregando-se o Kit *Syber GreenER qPCR Super Mix Universal INVITROGEN #11762* para os genes: Bact (Beta-actina) - RefSeq: NM_031144.3; IL1b (Interleucina 1-beta) - RefSeq: NM_031512.2; IL2 (Interleucina 2) - RefSeq: NM_053836.1; IL4 (Interleucina 4) - RefSeq: NM_201270.1; IL6 (Interleucina 6) e RefSeq: NM_012589.2; IL10 (Interleucina 10). As sequencias de primers foram descritos na **Tabela 1**.

O gene constitutivo Beta-actina (BACT) foi utilizado como controle endógeno das reações e os produtos das reações de RT- qPCR foram quantificados pelo método relativo $\Delta\Delta Ct$, corrigindo-se assim, a quantidade de ácido nucleico de interesse pelo gene de referência e, comparando-se ao grupo controle.

Tabela 1: Genes e sequência de primers

GENE	PRIMER SENSO	PRIMER ANTISENSO
BACT	AGGGAATCGTGCGTGACAT	CCATACCCAGGAAGGAAGGC
IL-1 β	ACTGAACTTCGGGTGATCG	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC
IL-2	CCAAGCAGGCCACAGAATTG	CAAATCCAACACACGCTGCA
IL-4	GGAGAACGAGCTCATCTGCA	GGTGCAGCTTCTCAGTGAGT
IL-6	CCATCTGCCCTTCAGGAACA	ACTGGCTGGAAGTCTCTTGC
IL-10	GCTCAGCACTGCTATGTTGC	TGTTGTCCAGTCGGTCCTTC

3.9 Análise Estatística

Os resultados deste estudo foram analisados através de comparação entre os grupos, aplicando-se análise de variância (ANOVA) de um fator, com pós-teste adequado de Tukey, sendo considerados significativos os valores de “p” inferiores a 0,05. Os cálculos foram efetuados através do software GraphPad Prism® versão 7.0 e os resultados apresentados como média \pm erro padrão [48].

3.10 Ensaio de Migração Celular

Com o objetivo de verificar a permanência das CTmTA aplicadas no espaço subcapsular, utilizamos 2 animais Wistar machos albinos, com peso entre 220 e 280 g

e realizamos o seguinte ensaio de fluorescência: Três inóculos de células (tubos contendo 10 μ L de solução de 2×10^6 CTmTA ressuspendidas em PBS estéril) foram incubados com uma solução de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Thermo Fisher Scientific), por 30 minutos, ao abrigo da luz, a 37°C graus. Os tubos foram então centrifugados, descartou-se o sobrenadante, e o pellet de células foi ressuspendido novamente em 10 μ L de PBS estéril. Um desses inóculos foi aplicado sobre uma lâmina histológica, montado com lamínula e observado ao microscópio de fluorescência sob luz UV, para verificar a marcação das CTmTA com o DAPI (**Figura 5**).

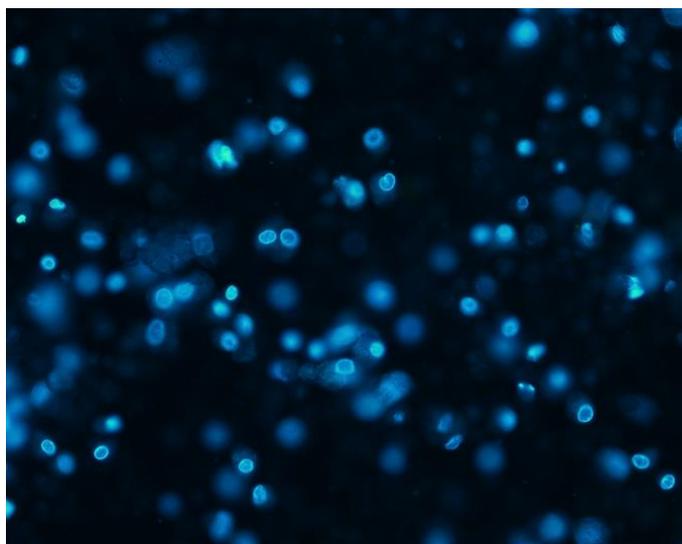


Figura 5: Esfregaço de 2×10^6 CTmTA marcadas com DAPI, observadas ao microscópio de fluorescência, sob aumento final de 400x

Após a verificação da eficácia da marcação, 2 inóculos de células marcadas foram aplicados no espaço subcapsular renal de 2 animais submetidos ao modelo Nx, após 15 dias da indução da DRC (inoculação aos 15 dias). Um desses animais foi eutanasiado após 24 horas da inoculação e o outro, foi acompanhado até 15 dias após a inoculação (30 dias de Nx), conforme esquematizado na **Figura 6**.

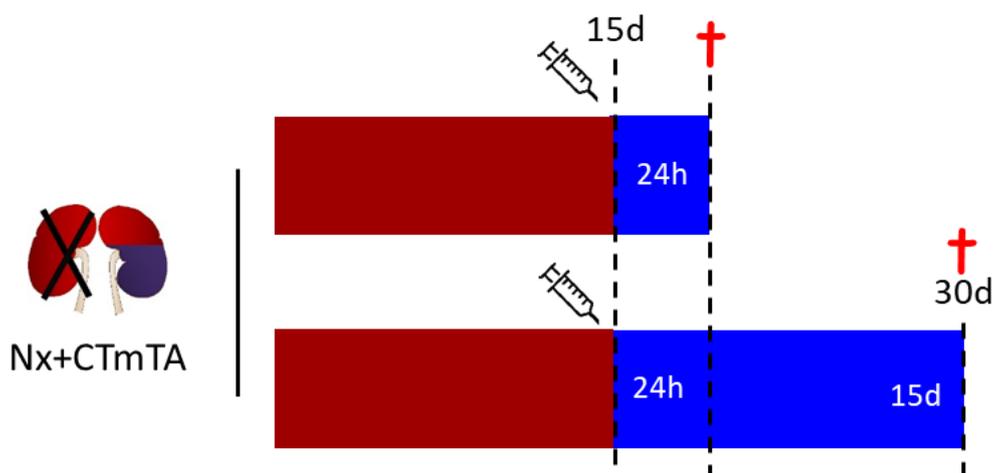


Figura 6: Desenho Experimental do Ensaio de Migração Celular, com os animais sacrificados 24h e 15d após a inoculação das células, que ocorreu 15 dias após a cirurgia de ablação renal de 5/6

Nos respectivos tempos de análise, os animais foram eutanasiados por injeção de dose letal de Tiopental (0,1 g), o rim esquerdo, onde foram inoculadas as CTmTA, foi rapidamente congelado e submetido a microtomia em criostato, para a obtenção de cortes histológicos de tecido criopreservado, de espessura de 4 μm . Esses tecidos foram corados com azul de Evans a 0,6% e analisados em microscópio de fluorescência para verificação da presença das CTmTA, conforme observado na **Figura 7**.

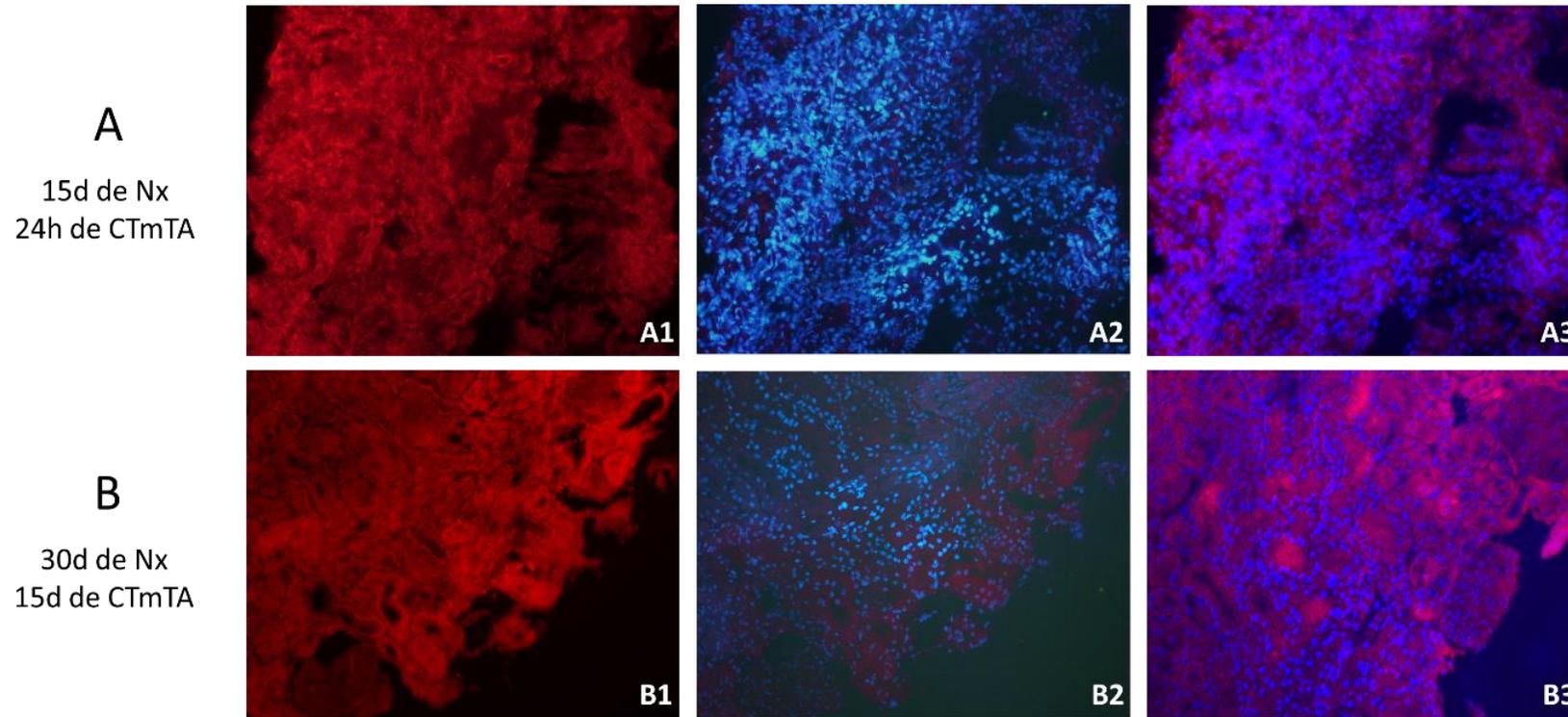


Figura 7: Visualização das CTmTA marcadas com DAPI 24h (A) e 15d (B) após a inoculação, que ocorreu após 15d de ablação renal de 5/6. Aumento final de 200x. A inoculação das células no tecido já acometido por DRC parece ter promovido maior adesão das células ao parênquima renal e maior permanência das mesmas após 15 dias.

4. RESULTADOS

Os principais resultados dos parâmetros de acompanhamento obtidos no presente estudo foram apresentados na **Tabela 2** como média \pm erro padrão e “N”, enquanto os parâmetros analisados somente ao final do estudo foram apresentados na **Tabela 3** também como média \pm erro padrão e “N”, ao final da seção de resultados.

4.1 Peso Corpóreo

Os resultados detalhados do ganho ponderal dos animais dos diferentes grupos foram apresentados na **Tabela 2** e como gráfico de linhas na **Figura 8**.

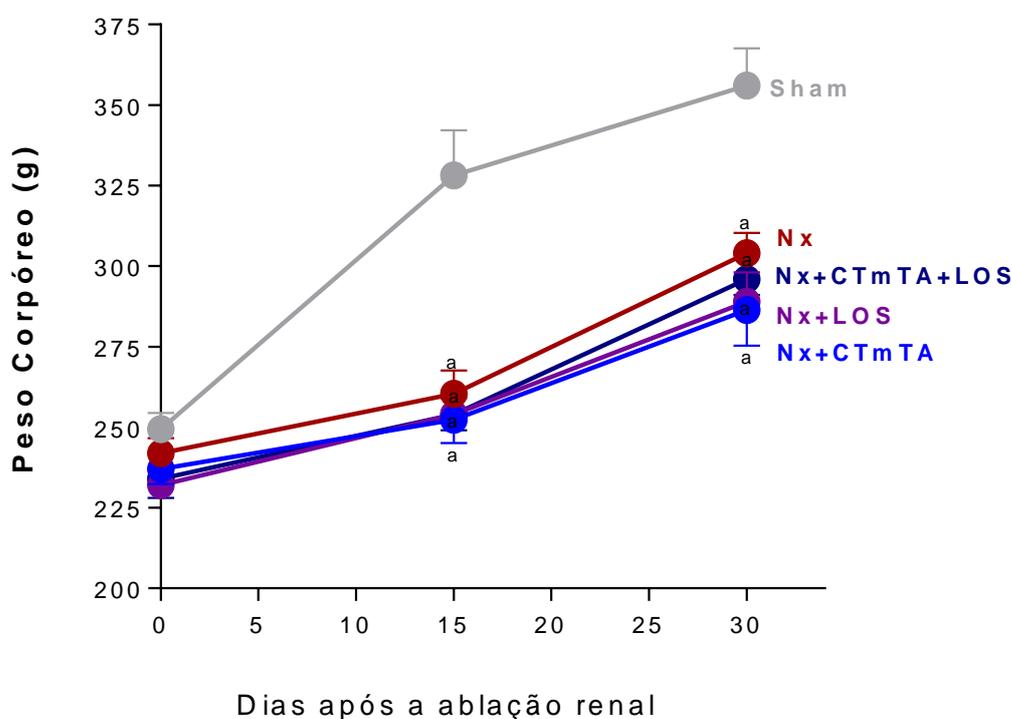


Figura 8 - Evolução ponderal dos animais ao longo do período de estudo (a: $p < 0,05$ vs. Sham, b: $p < 0,05$ vs. Nx, c: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA, d: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS, nos respectivos tempos de estudo)

Corroborando dados previamente obtidos por este e outros grupos de pesquisa, os animais Nx apresentaram menor ganho ponderal em relação aos animais Sham, ao longo do estudo. Essa diferença foi estatisticamente significativa já aos 15 dias e se manteve 30 dias após a cirurgia de ablação renal. Não foi observado efeito de

nenhum dos tratamentos empregados sobre este parâmetro. A **Figura 9** traz um gráfico de barras em que podemos analisar os valores finais de peso corpóreo de cada grupo experimental, ao término dos períodos de estudo (15 e 30 dias). Conforme o gráfico, todos os animais submetidos à ablação renal de 5/6 apresentaram peso corpóreo final significativamente inferior ao observado nos animais Sham.

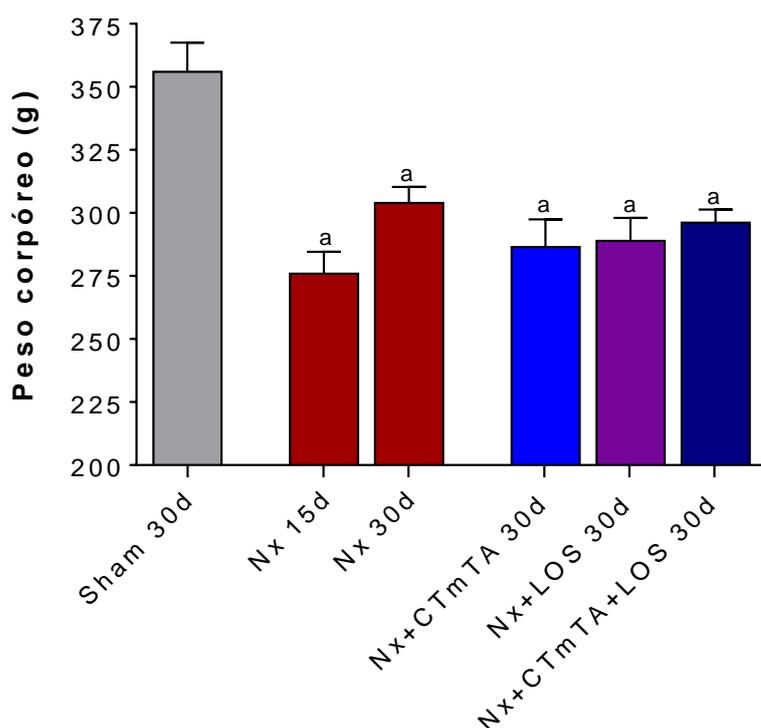


Figura 9 - Peso corpóreo (g) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.2 Pressão Sistólica Caudal

Os resultados das aferições da pressão sistólica caudal dos animais dos diferentes grupos podem ser observados como média \pm erro padrão e “N” na **Tabela 2** e como gráfico de linhas na **Figura 10**.

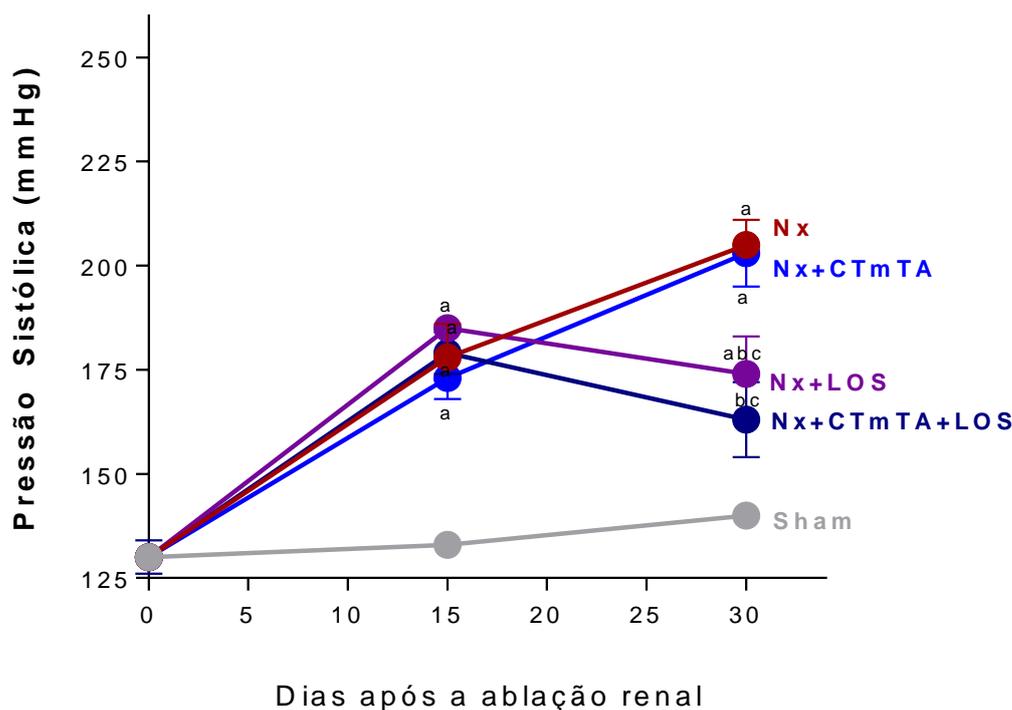


Figura 10 - Pressão sistólica caudal (mmHg) dos animais ao longo do período de estudo (a: $p < 0,05$ vs. Sham, b: $p < 0,05$ vs. Nx, c: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA, d: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS, nos respectivos tempos de estudo)

Os animais do grupo Sham mantiveram-se normotensos ao longo de todo o estudo. Corroborando dados prévios, os animais submetidos a ablação renal de 5/6 apresentaram hipertensão arterial significativa aos 15 dias após a ablação renal, quando comparados ao grupo controle e esse parâmetro continuou em progressão até o término do estudo, nos grupos Nx e Nx+CTmTA.

Conforme esperado, os grupos Nx+LOS e Nx+CTmTA+LOS apresentaram redução significativa nos valores de hipertensão arterial, quando comparados aos grupos que não foram tratados com o Losartan. Surpreendentemente, a associação deste tratamento farmacológico com a aplicação subcapsular de CTmTA promoveu a

redução ainda mais pronunciada da hipertensão arterial, que aos 30 dias de acompanhamento não foi diferente do ponto de vista estatístico entre os grupos Sham e NX+LOS+CTmTA.

A **Figura 11** traz um gráfico de barras em que podemos analisar os valores finais de pressão sistólica caudal dos animais de cada grupo experimental, ao término dos períodos de estudo.

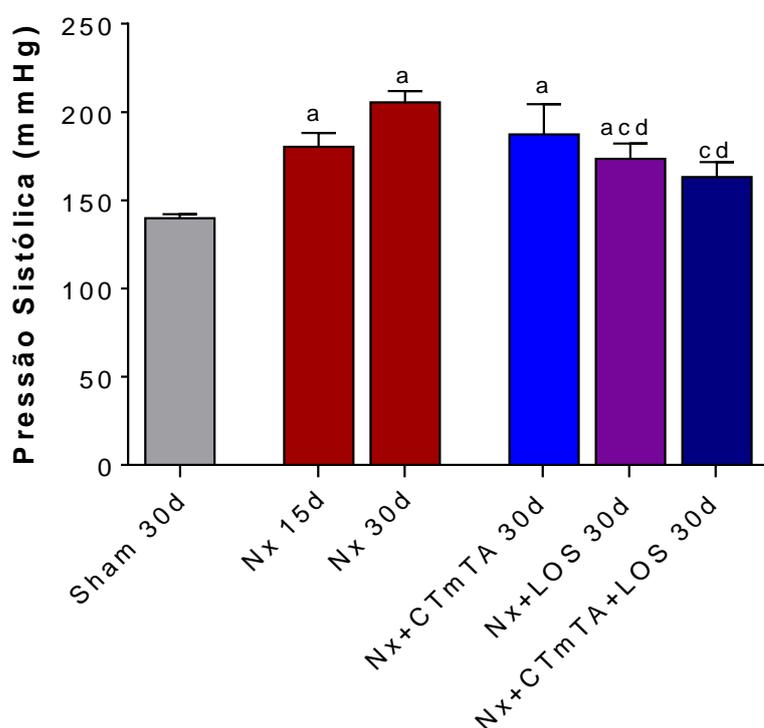


Figura 11 - Pressão sistólica caudal (mmHg) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.3 Volume Urinário

A **Tabela 2** traz o resultado da avaliação do volume urinário de 24 horas excretado pelos animais dos diferentes grupos, na qual os dados estão apresentados como média \pm erro padrão e “N” de cada grupo. Esses mesmos dados foram apresentados também como gráfico de linhas na **Figura 12**.

Conforme esperado, os animais Nx de todos os grupos do estudo apresentaram maior volume urinário em relação aos animais Sham, provavelmente refletindo a lesão tubular característica deste modelo experimental, o que leva os animais Nx a terem uma redução na capacidade de concentrar a urina em relação ao plasma sanguíneo. Essa diferença foi estatisticamente significativa, em todos os grupos, após 15 e 30 dias de cirurgia.

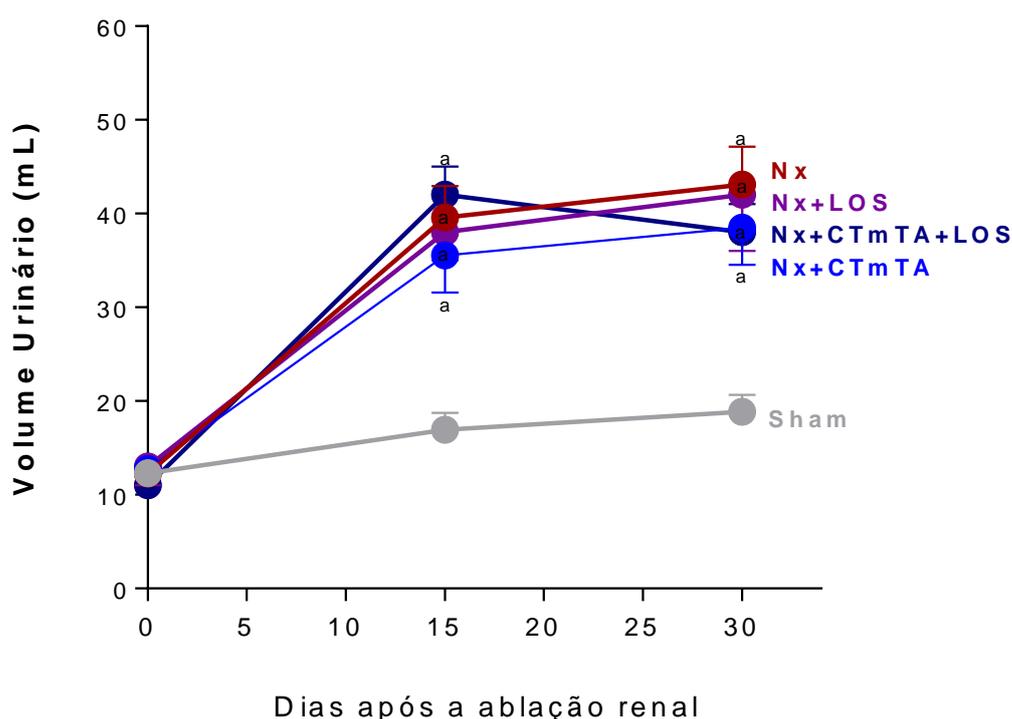


Figura 12 - Volume urinário (mL) dos animais ao longo do período de estudo (a: $p < 0,05$ vs. Sham, b: $p < 0,05$ vs. Nx, c: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA, d: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS, nos respectivos tempos de estudo)

A **Figura 13** traz um gráfico de barras com os valores do volume urinário apresentados por cada grupo ao término do período de estudo. Conforme observado, nenhum dos tratamentos empregados reduziu a poliúria associada ao modelo Nx.

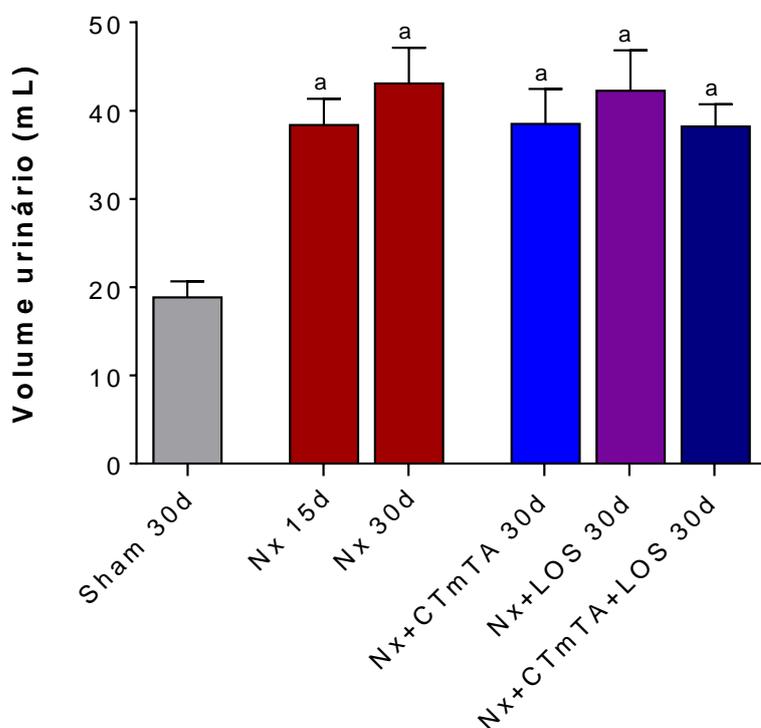


Figura 13 - Volume urinário (ml) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6
(a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.4 Proteinúria

A **Tabela 2** e o gráfico de linhas da **Figura 14** trazem os resultados da avaliação da proteinúria de 24 horas dos grupos de animais em cada ponto de análise do estudo. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão e “N” de cada grupo.

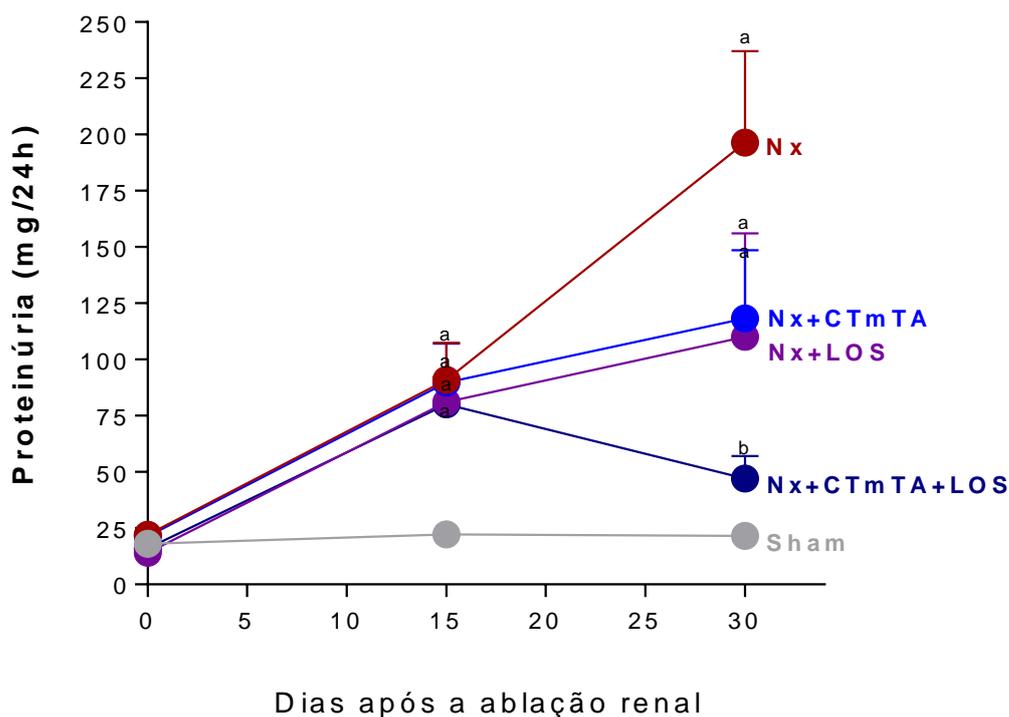


Figura 14 - Proteinúria (mg/24h) dos animais dos ao longo do período de estudo (a: $p < 0,05$ vs. Sham, b: $p < 0,05$ vs. Nx, c: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA, d: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS, nos respectivos tempos de estudo)

Conforme podemos observar, os valores basais de proteinúria dos animais analisados em tempo zero, antes da indução da DRC, eram muito semelhantes entre si. Corroborando trabalhos anteriormente publicados, os animais Nx já apresentaram proteinúria significativa aos 15 dias de ablação renal, quando comparados ao grupo controle, provavelmente refletindo a perda de seletividade da barreira de filtração glomerular desses animais.

Após 15 dias da indução da DRC, os animais Nx foram subdivididos nos grupos Nx, Nx+CTmTA, Nx+LOS e Nx+LOS+CTmTA baseando-se nos valores iniciais de proteinúria semelhantes em todos os grupos. A partir desse ponto, podemos verificar

que, nos animais Nx mantidos sem tratamento a proteinúria continuou progredindo, e aos 30 dias após a indução da DRC, atingiu aproximadamente o dobro do valor observado aos 15 dias. A administração de ambas as monoterapias promoveu desaceleração da progressão da proteinúria nos animais Nx+CTmTA e Nx+LOS, respectivamente, em relação aos animais Nx mantidos sem tratamento, após 30 dias da indução da DRC. Surpreendentemente, nos animais tratados com Losartan, associado a uma aplicação subcapsular de 2×10^6 CTmTA, houve não só o bloqueio da progressão da proteinúria, mas também uma regressão desse parâmetro, evidenciada pela diferença estatística observada neste grupo.

Para avaliarmos mais profundamente o impacto dos tratamentos sobre este parâmetro, calculamos o delta da proteinúria (Δ de Proteinúria) individual, de cada animal durante o período de tratamento, obtido a partir da seguinte subtração: (Proteinúria final, aos 30d) – (Proteinúria antes do início dos tratamentos, aos 15d). Esse cálculo foi feito individualmente para cada animal, e os valores de média e erro padrão, foram empregados na construção do gráfico apresentado na **Figura 15**.

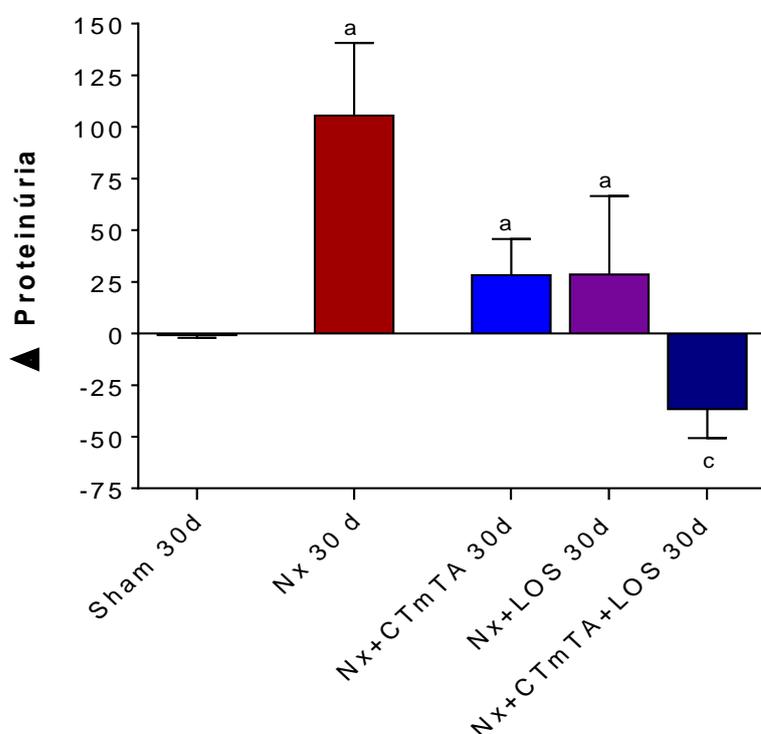


Figura 15 - Δ Proteinúria após 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx Nx 30d; c: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

Como observado, os animais Nx mantidos sem tratamento tiveram uma progressão da proteinúria de aproximadamente 100% entre os pontos 15d e 30d, isto é, praticamente dobraram o valor de proteinúria entre esses dois pontos de análise, enquanto, os grupos que receberam as monoterapias, apresentaram um aumento em torno de apenas 25% neste parâmetro. Admiravelmente, os animais submetidos ao tratamento com Losartan associado à aplicação subcapsular de CTmTA aos 15d de Nx, apresentaram uma regressão de mais de 30% na proteinúria durante esse mesmo período.

Por fim, a **Figura 16** traz um gráfico de barras em que podemos analisar os valores finais de proteinúria de cada grupo experimental, ao término do período de estudo.

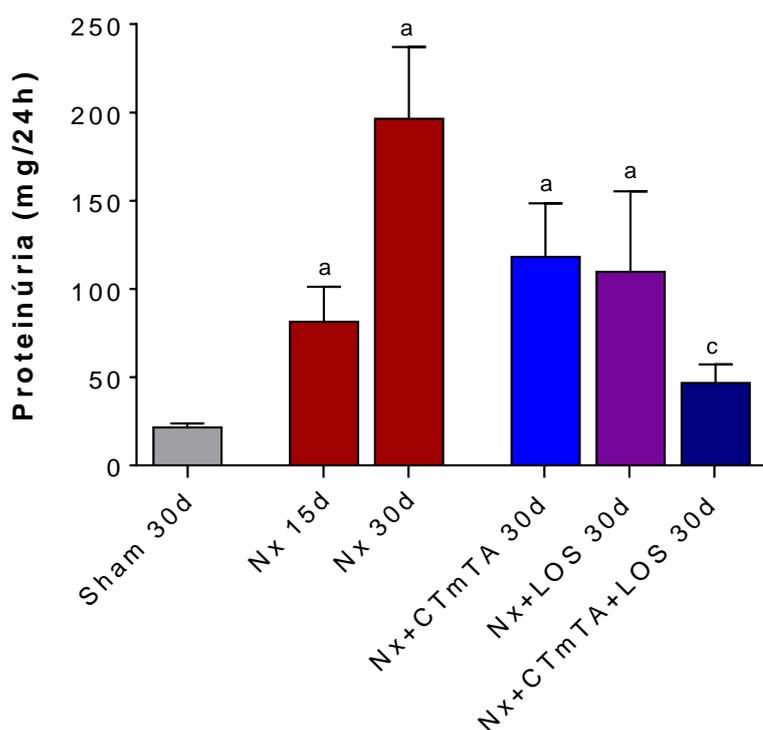


Figura 16 - Proteinúria (mg/24 h) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.5 Albuminúria

Os resultados detalhados da albuminúria dos animais dos diferentes grupos foram apresentados como média \pm erro padrão e “N” na **Tabela 2** e como gráfico de linhas na **Figura 17**.

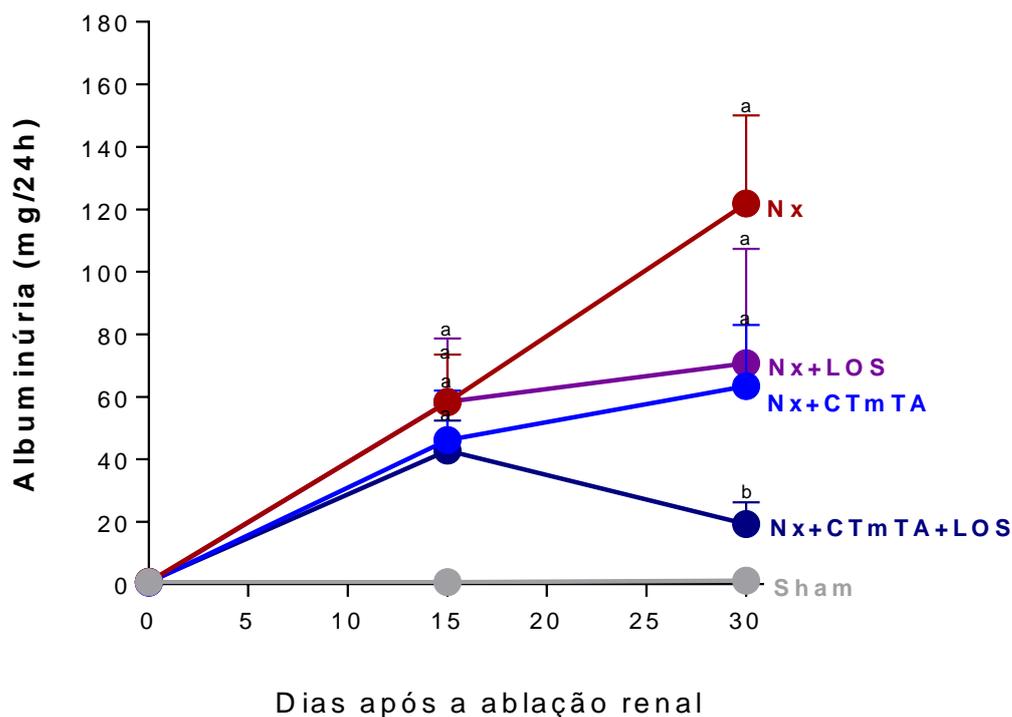


Figura 17 - Albuminúria (mg/24h) dos animais ao longo do período de estudo (a: $p < 0,05$ vs. Sham, b: $p < 0,05$ vs. Nx, c: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA, d: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS, nos respectivos tempos de estudo)

Conforme podemos observar, os valores basais de albuminúria dos animais analisados em tempo zero, antes da indução da DRC, eram muito semelhantes entre si. Corroborando os resultados obtidos em estudos anteriores, os animais submetidos à ablação renal de 5/6 já apresentavam albuminúria significativa após 15 dias da indução da DRC, supostamente refletindo a perda de seletividade da barreira de filtração glomerular.

Após 15 dias da indução da DRC, os animais Nx foram subdivididos nos grupos Nx, Nx+CTmTA, Nx+LOS e Nx+LOS+CTmTA utilizando-se para esta divisão, os valores iniciais de albuminúria semelhantes em todos os grupos, como podemos

observar no ponto 15d do gráfico de linhas. A partir desse ponto, podemos verificar que, nos animais Nx mantidos sem tratamento, a albuminúria continuou progredindo e, 30 dias após a indução da DRC, atingiu aproximadamente o dobro do valor observado aos 15 dias.

Uma desaceleração na progressão da albuminúria foi observada nos animais dos grupos NX+CTmTA e Nx+LOS, após o 15º dia de cirurgia, no entanto, apenas nos animais tratados com Losartan, associado a uma aplicação subcapsular de 2×10^6 CTmTA, observou-se a regressão significativa.

Para realizarmos uma avaliação mais minuciosa do impacto dos tratamentos sobre este parâmetro, calculamos o delta da albuminúria (Δ de Albuminúria) individual, de cada animal durante o período de tratamento, obtido a partir da seguinte subtração:
 $= (\text{Albuminúria final, aos 30d}) - (\text{Albuminúria antes do início dos tratamentos, aos 15d})$.
 Esse cálculo foi realizado individualmente para cada animal, e os valores de média e erro padrão, foram empregados na construção do gráfico apresentado na **Figura 18**.

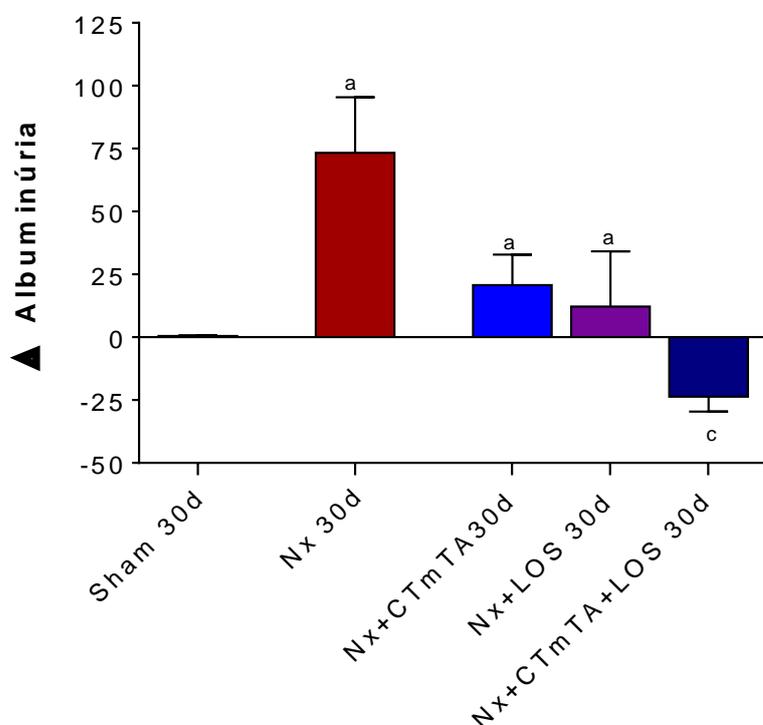


Figura 18 - Δ Albuminúria após 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx Nx 30d; c: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

Como observado, os animais Nx mantidos sem tratamento tiveram uma progressão da albuminúria de aproximadamente 75% entre os pontos 15d e 30d, enquanto nos grupos submetidos a ambas as monoterapias, a progressão foi menor, em torno de apenas, 25%. Surpreendentemente, os animais submetidos ao tratamento com Losartan associado à aplicação subcapsular de CTmTA, aos 15d de Nx, apresentaram uma regressão de mais de 25% na albuminúria durante esse mesmo período.

Por fim, a **Figura 19** traz um gráfico de barras em que podemos analisar os valores finais de albuminúria de cada grupo experimental, ao término do período de estudo.

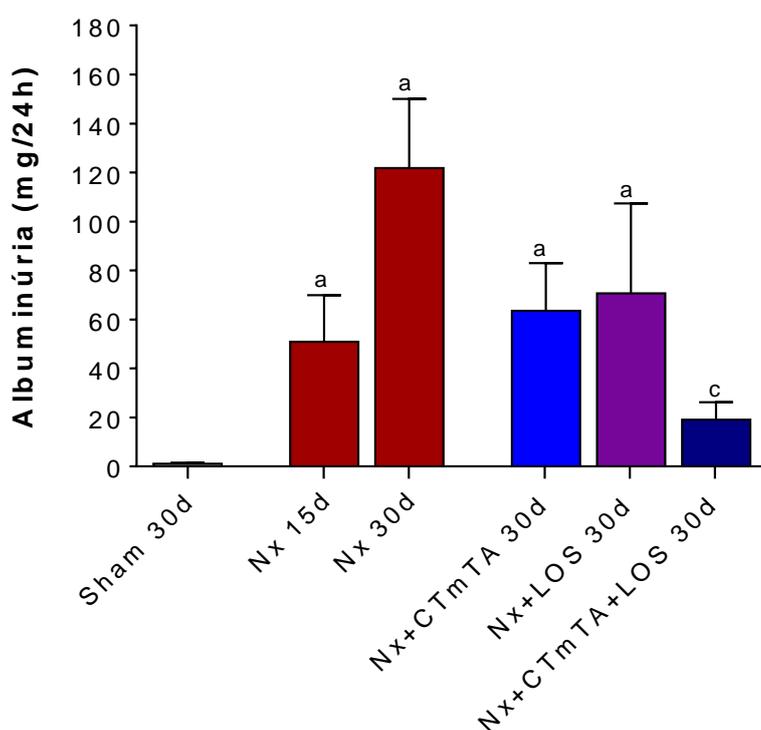


Figura 19 – Albuminúria (mg/24 h) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.6 Sobrevida dos animais entre o 15º e o 30º dia de ablação renal de 5/6

Os resultados da sobrevida dos animais dos diferentes grupos experimentais foram apresentados como média \pm erro padrão e “N” na **Tabela 3** e como gráfico de barras na **Figura 20**.

Conforme observado, não houve mortalidade no grupo de animais Sham 30d (sobrevida de 100%). Corroborando dados publicados previamente, ocorreu uma mortalidade de 8% nos animais Nx mantidos sem tratamento até 30 dias de ablação renal (sobrevida de 92% no grupo Nx 30d), ao passo que, a aplicação subcapsular de CTmTA reduziu para apenas 7% a mortalidade dos animais do grupo Nx+CTmTA 30d (sobrevida de 93%). Surpreendentemente, não foi observada mortalidade nos grupos de animais Nx tratados com Losartan, em monoterapia ou em associação à aplicação de CTmTA entre o 15º e o 30º dias de ablação (sobrevida de 100% nos grupos Nx+LOS 30d e Nx+LOS+CTmTA 30d).

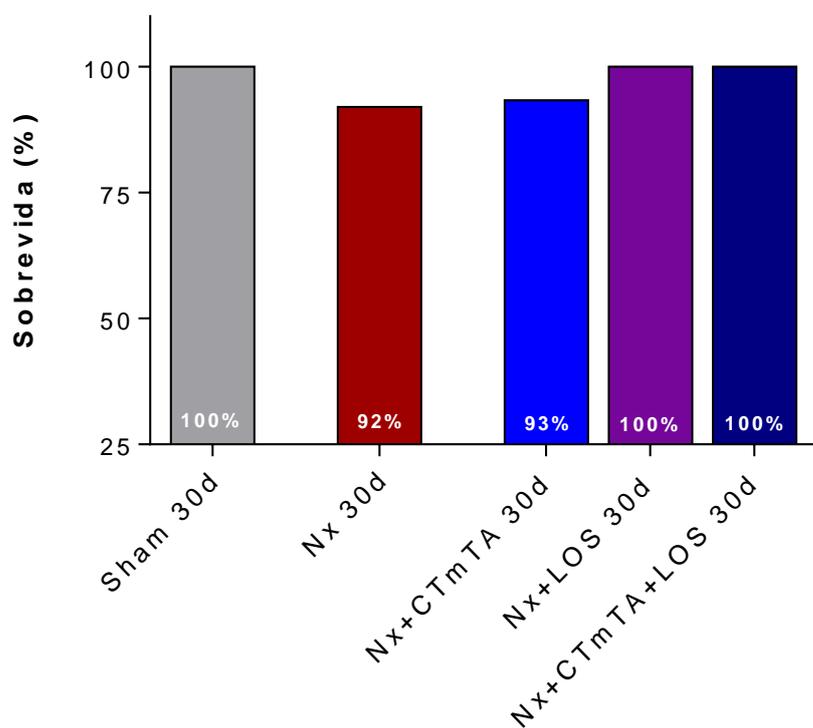


Figura 20 - Sobrevida dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6

(a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; c: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d;

d: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d

4.7 Creatinina Sérica

Os resultados da concentração sérica de creatinina dos animais dos diferentes grupos foram apresentados como média \pm erro padrão e “N” na **Tabela 3** e como gráfico de barras na **Figura 21**.

A análise da concentração sérica de creatinina entre os diferentes grupos experimentais mostrou que os animais submetidos a ablação renal de 5/6 apresentaram uma tendência numérica a retenção de creatinina sérica, quando comparados aos animais do grupo Sham, sugerindo o estabelecimento da DRC e da perda de função renal.

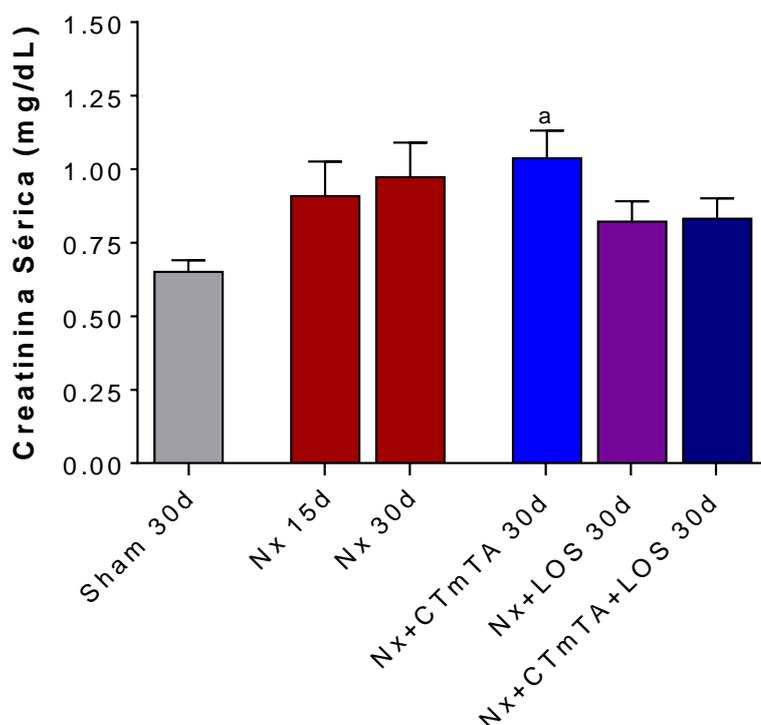


Figura 21 - Creatinina sérica (mg/dL) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.8 Clearance de Creatinina

Os resultados do clearance de creatinina dos animais dos diferentes grupos foram apresentados como média \pm erro padrão e “N” na **Tabela 3** e como gráfico de barras na **Figura 22**.

A análise do clearance de creatinina entre os diferentes grupos experimentais mostrou que os animais submetidos a ablação renal de 5/6 apresentaram uma tendência numérica a retenção de creatinina sérica, quando comparados aos animais do grupo Sham, sugerindo o estabelecimento da DRC e da perda de função renal. Corroborando os dados observados com as dosagens de creatinina sérica, a administração subcapsular de CTmTA em monoterapia ou em associação, não foi eficaz em promover a normalização da depuração de creatinina nesses animais.

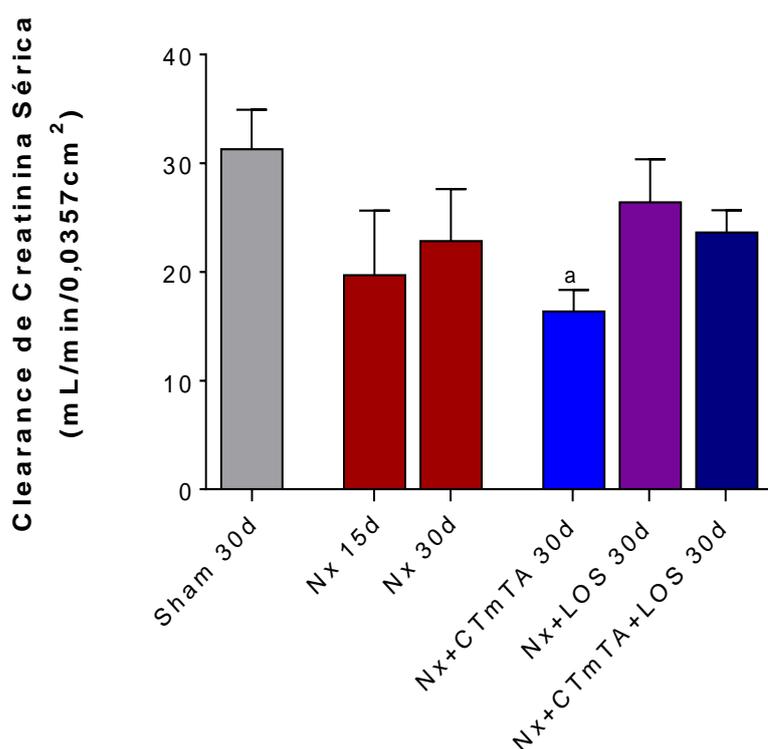


Figura 22 – Clearance de Creatinina sérica (mg/dL) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.9 Ureia Sérica

A **Tabela 3** demonstra os resultados detalhados da concentração sérica de ureia dos diferentes grupos de animais. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão e “N” de cada grupo e como gráfico de barras na **Figura 23**.

Corroborando os resultados observados com as dosagens de creatinina sérica, e confirmando o estabelecimento de DRC grave nos animais submetidos a este modelo experimental, observamos a retenção de ureia sérica em todos os grupos Nx, quando comparados aos animais do grupo Sham. Assim como o observado com a avaliação da retenção de creatinina, nenhum dos tratamentos empregados alterou este parâmetro.

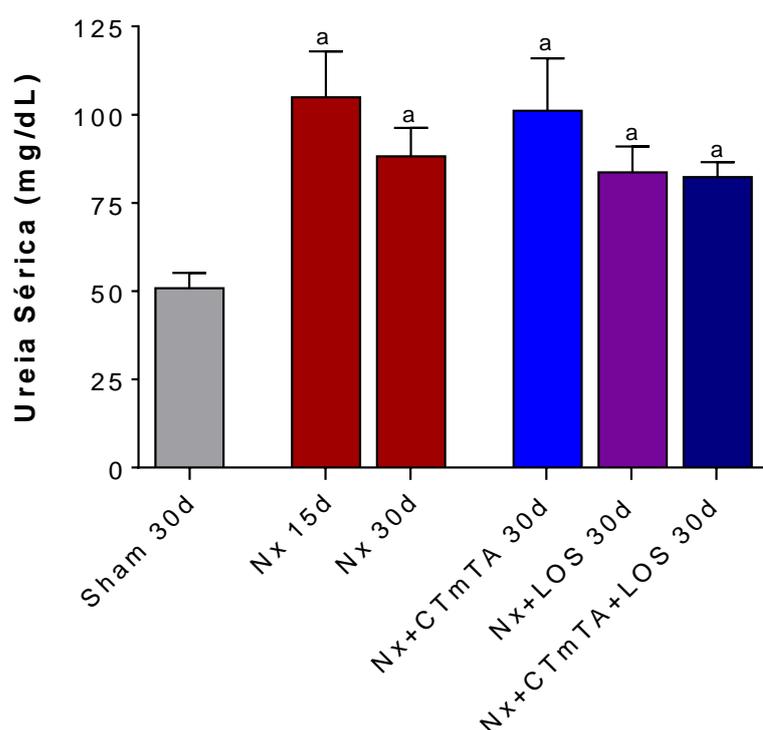


Figura 23 - Ureia sérica (mg/dL) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.10 Hipertrofia Renal

A análise da hipertrofia renal dos animais dos diferentes grupos experimentais foi demonstrada na **Tabela 3** como média \pm erro padrão e “N” e como gráfico de barras na **Figura 24**.

Observou-se uma diferença significativa entre o peso renal dos animais dos grupos submetidos a ablação renal de 5/6 aos 15 e aos 30 dias, quando comparados aos animais do grupo Sham 30d, em decorrência da hipertrofia da massa renal remanescente presente nesse modelo experimental, a qual se manteve em todos os animais Nx, independentemente da administração de qualquer tratamento. É importante, porém ressaltar que foi observada uma discreta tendência numérica a redução da hipertrofia renal no grupo Nx+CTmTA+LOS 30d.

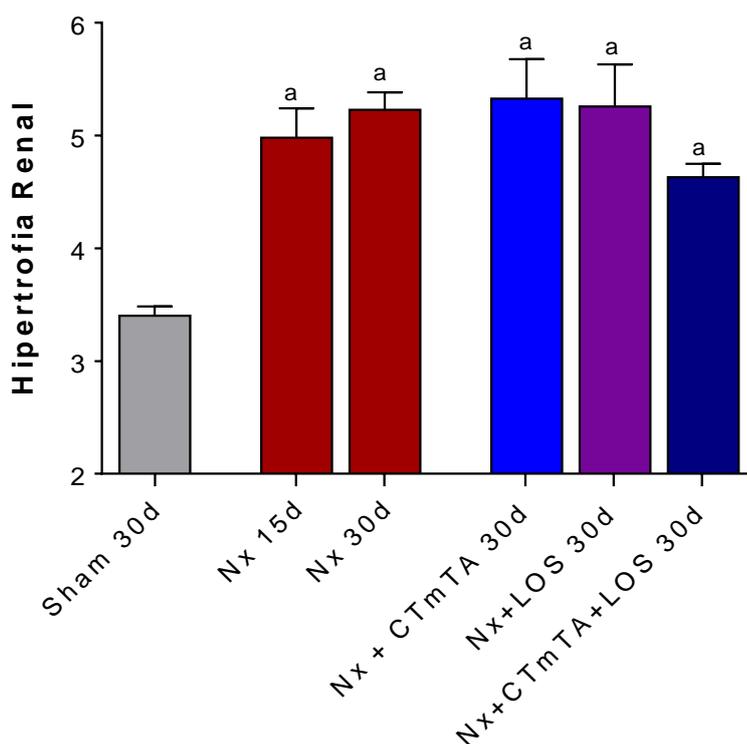


Figura 24 – Hipertrofia renal dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.11 Esclerose Glomerular

Para a avaliação da porcentagem de esclerose glomerular, as lâminas de tecido renal dos animais dos diferentes grupos experimentais foram coradas através da técnica histológica do ácido periódico de Schiff (PAS) e analisadas sob aumento final de 400x. A **Figura 25** traz microfotografias ilustrativas dos padrões de coloração observados nos animais dos seis grupos do estudo.

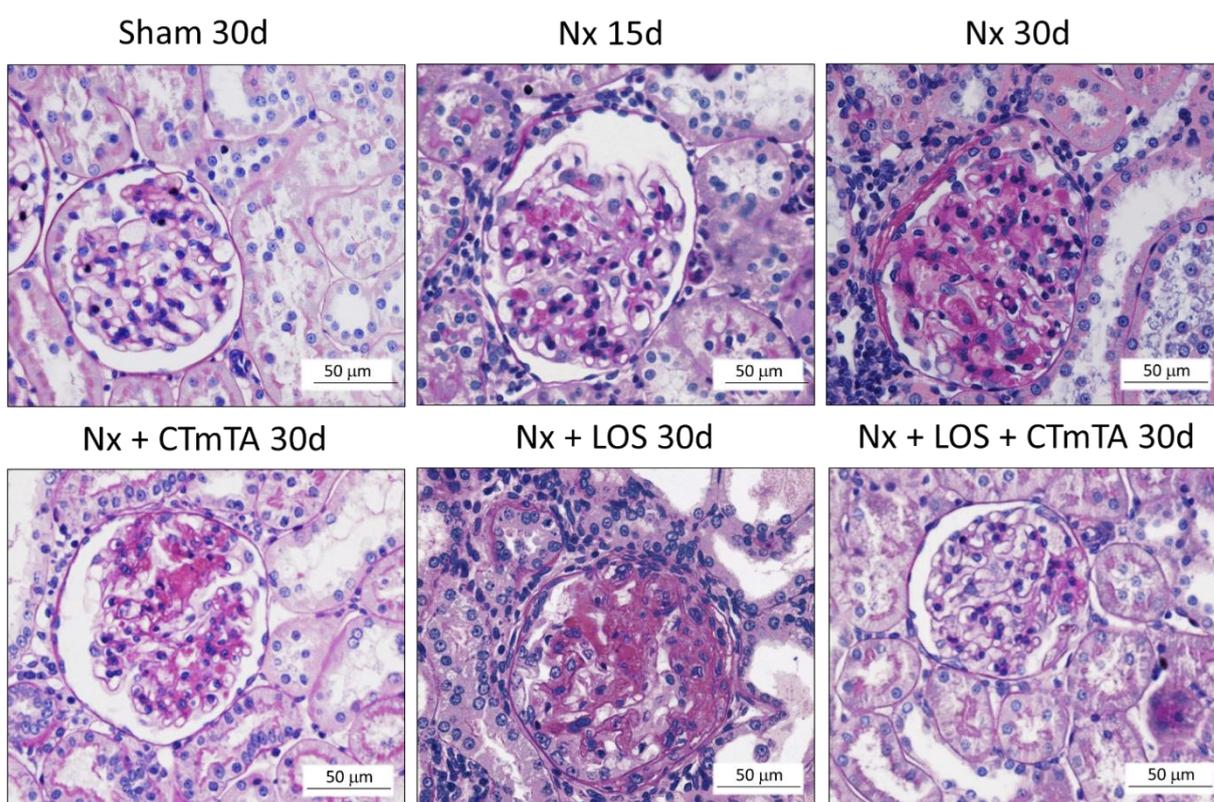


Figura 25 - Microfotografias ilustrativas de lâminas coradas pela reação de PAS para avaliação de glomerulosclerose nos animais dos diferentes grupos experimentais

A **Figura 26** apresenta um gráfico de barras que ilustra o resultado da quantificação da porcentagem de glomerulosclerose em cada um dos grupos experimentais analisados. Os dados foram também apresentados na **Tabela 3** como média \pm erro padrão e “N” de cada grupo.

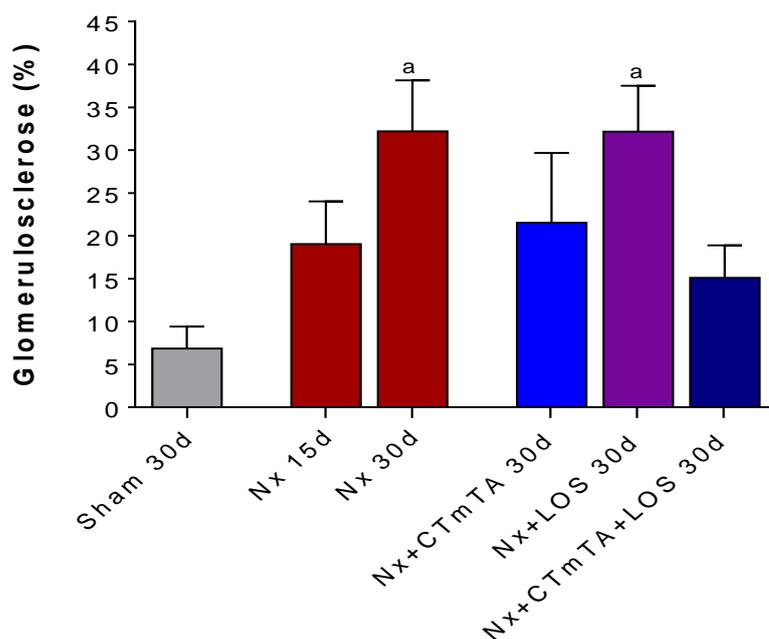


Figura 26 - Porcentagem de Glomerulosclerose (%) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

Analisando-se a arquitetura glomerular nos diversos grupos do estudo, notou-se que os animais submetidos a ablação renal de 5/6 já apresentavam porcentagem de glomerulosclerose numericamente elevada após 15 dias da indução da DRC, quando comparados ao grupo controle, com progressão significativa aos 30 dias, no grupo Nx sem tratamento. Observou-se ainda, que o tratamento com CTmTA em monoterapia, ou em associação ao Losartan, conteve de maneira significativa a progressão deste parâmetro, enquanto, os animais tratados exclusivamente com Losartan apresentaram porcentagem de esclerose glomerular semelhante àquela observada nos animais mantidos sem tratamento.

4.12 Fibrose Intersticial

Para a avaliação da porcentagem de fibrose intersticial no córtex renal, as lâminas histológicas dos animais dos grupos experimentais foram coradas pela técnica do Tricrômico de Masson e analisadas sob aumento final de 200x. A **Figura 27** exemplifica microfotografias ilustrativas dos padrões de coloração observados nos animais dos seis grupos do estudo. Na **Tabela 3**, os dados foram apresentados como média \pm erro padrão e “N” de cada grupo e, na **Figura 28**, como gráfico de barras.

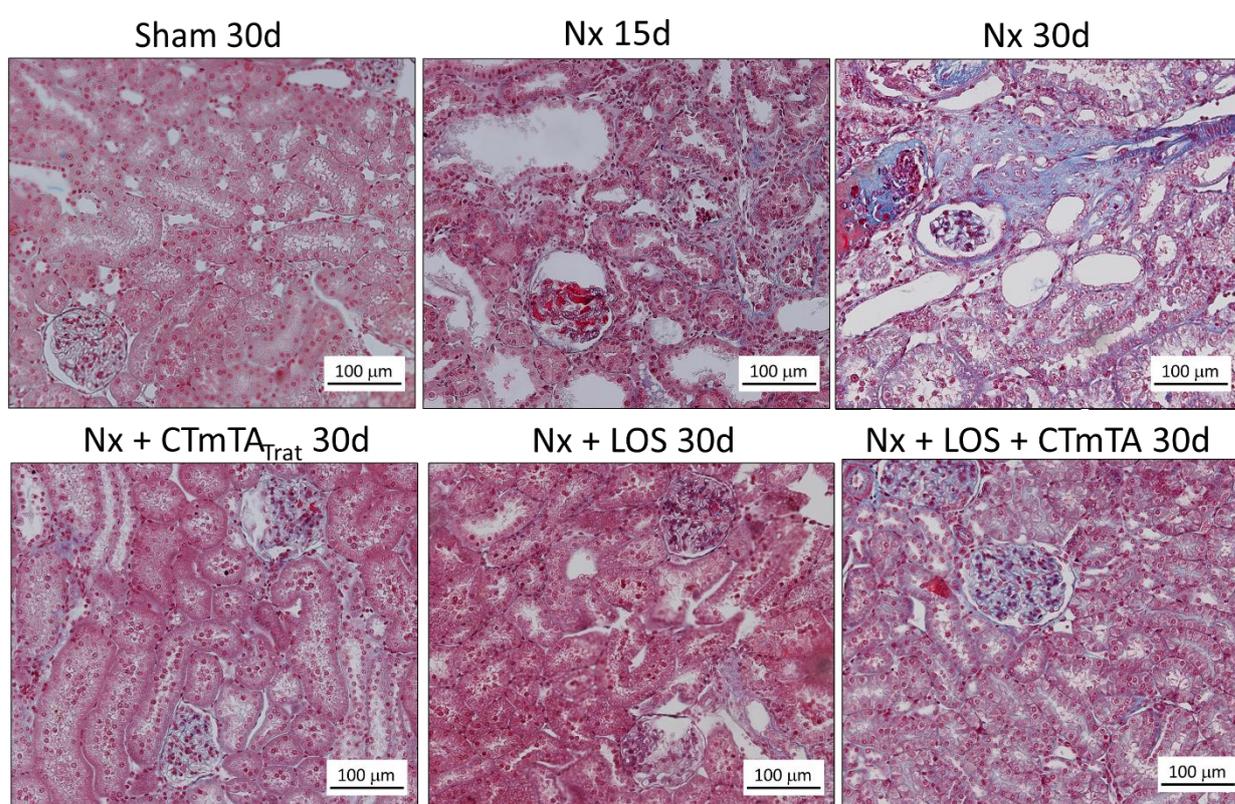


Figura 27 - Microfotografias ilustrativas de lâminas coradas pelo Tricrômico de Masson para avaliação de fibrose intersticial no córtex renal dos animais dos diferentes grupos experimentais

Aos 15 dias de ablação renal, os animais já apresentaram aumento significativo da área intersticial do córtex renal ocupada por colágeno, caracterizando a fibrose intersticial.

Apesar de não termos observada diferença estatística significativa entre a porcentagem de fibrose apresentada nos grupos Nx 15d e Nx 30d, é importante

ressaltar que este parâmetro praticamente dobrou numericamente no grupo mantido sem tratamento até 30 dias após a indução da DRC, quando comparado ao grupo sacrificado aos 15 dias. Por outro lado, os animais Nx que receberam ambas as monoterapias (Nx+LOS e Nx+CTmTA) ou a associação dos tratamentos (Nx+CTmTA+LOS), mantiveram valores de porcentagem de fibrose intersticial numericamente semelhantes àqueles observados nos animais Nx 15d, mesmo após 30 dias da indução da DRC, conforme observado na **Figura 28**.

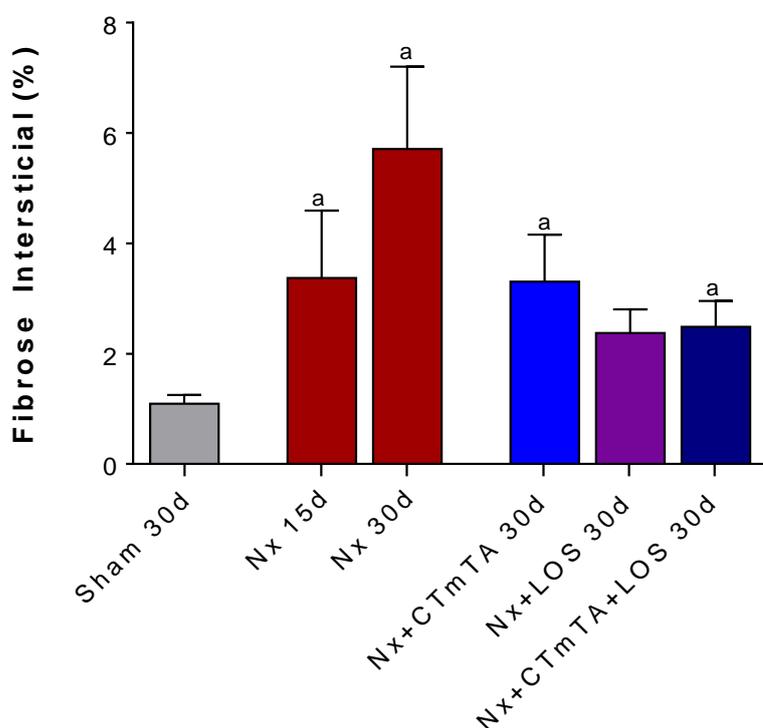


Figura 28 - Porcentagem de Fibrose Intersticial (%) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.13 Infiltração Intersticial de Miofibroblastos

A **Figura 29** traz microfotografias ilustrativas de lâminas histológicas de animais dos diferentes grupos experimentais, submetidas à reação de imuno-histoquímica para detecção de miofibroblastos, através da avaliação da porcentagem de área intersticial do córtex renal ocupada por α -SMA. As lâminas foram analisadas sob aumento final de 200x.

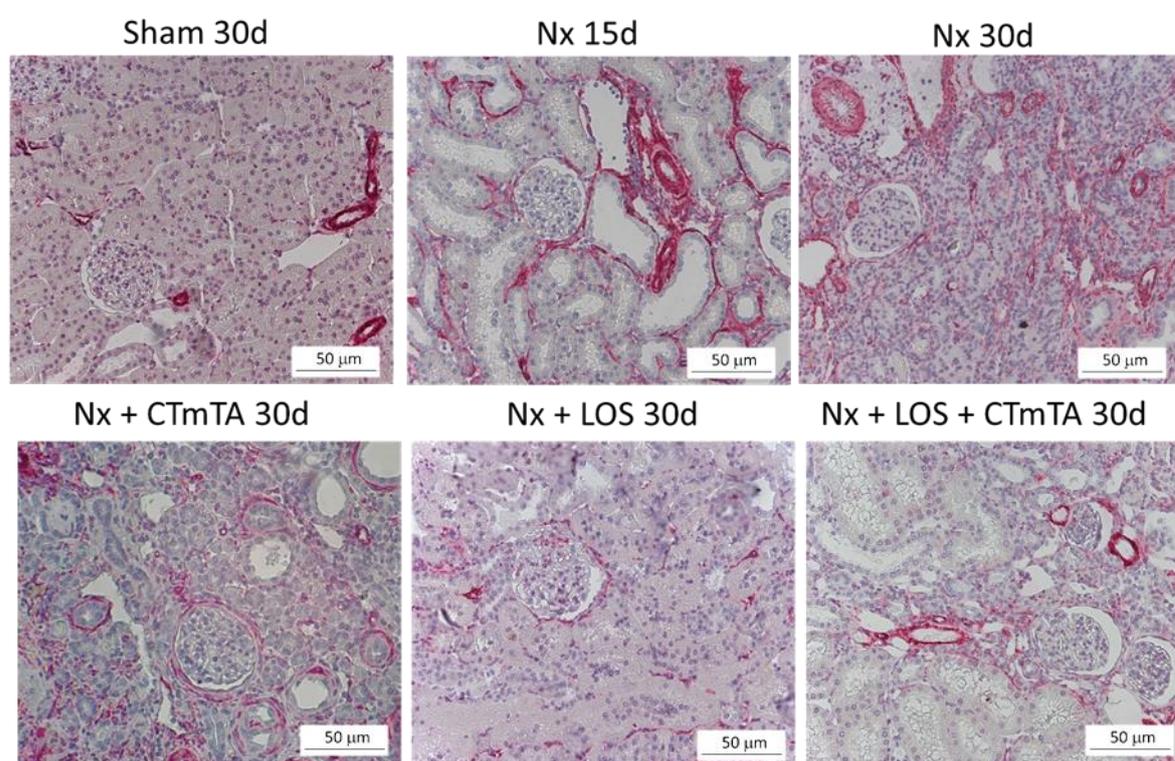


Figura 29 - Microfotografias ilustrativas de lâminas de Imuno-histoquímica para detecção de α -SMA no interstício renal dos animais dos diferentes grupos experimentais

Podemos observar a análise da infiltração intersticial de miofibroblastos no córtex renal dos animais dos diferentes grupos experimentais na **Tabela 3** como média \pm erro padrão e “N” e no gráfico de barras na **Figura 30**.

A fração do interstício cortical ocupada por α -SMA aumentou expressivamente nos animais dos grupos Nx, tanto aos 15 como aos 30 dias, sugerindo a ocupação deste compartimento por miofibroblastos. Nenhum dos tratamentos foi eficaz em reduzir significativamente a presença de miofibroblastos no interstício renal, embora

uma redução numérica possa ser observada nos grupos tratados quando comparados ao grupo sem qualquer tratamento.

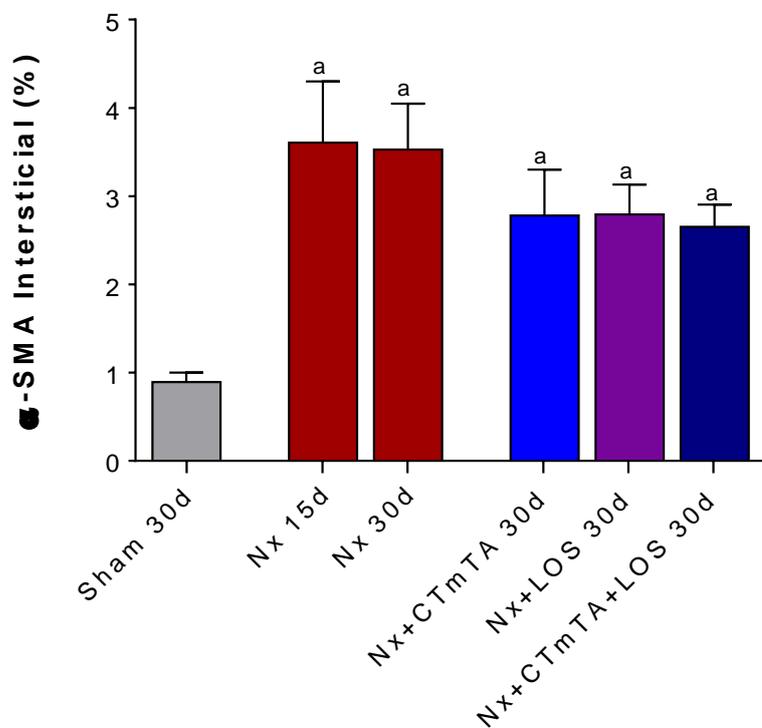


Figura 30 - Porcentagem de α -SMA (%) Intersticial dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.14 Infiltração Macrofágica Intersticial

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada para detecção e avaliação da infiltração de macrófagos CD68 (ED-1⁺) no interstício renal dos animais dos diferentes grupos experimentais. A **Figura 31** representa microfotografias ilustrativas dos padrões de marcação observados nos animais dos seis grupos do estudo.

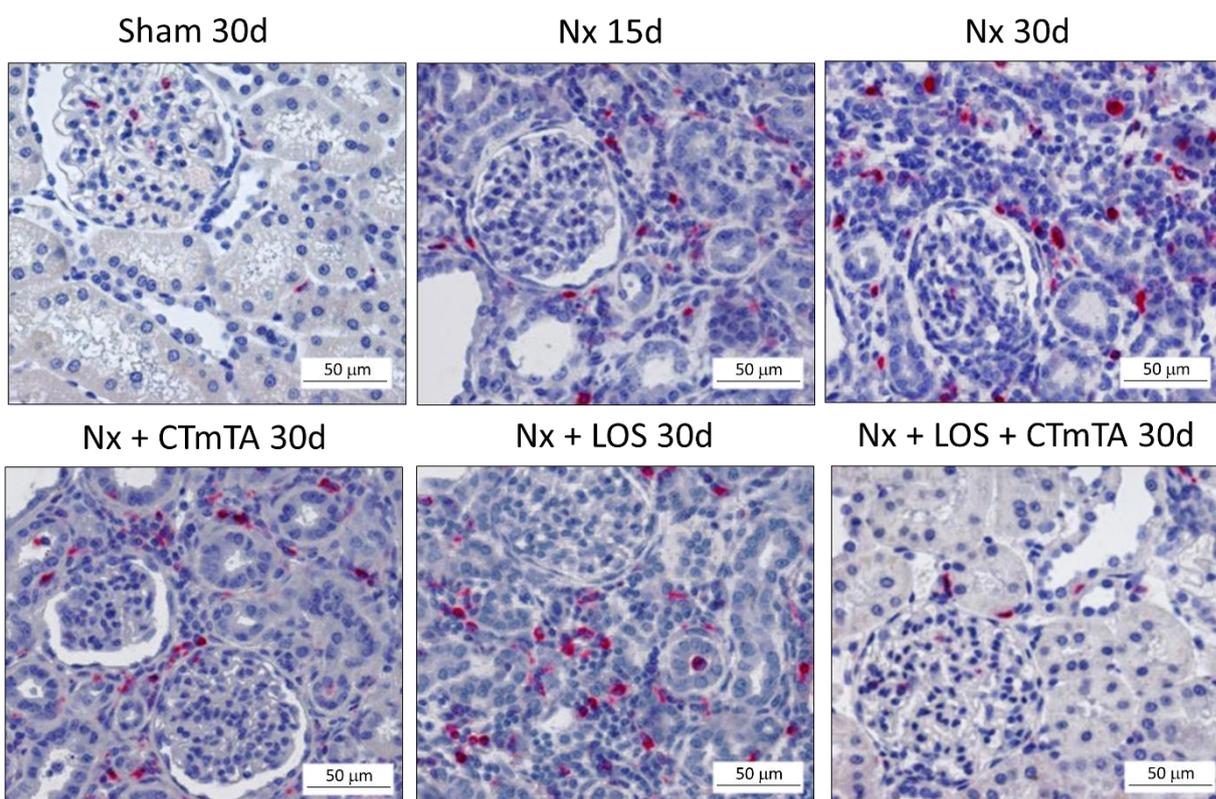


Figura 31 - Microfotografias ilustrativas de lâminas de Imuno-histoquímica para detecção de macrófagos no interstício renal dos animais dos diferentes grupos experimentais

A **Tabela 3** e a **Figura 32** apresentam os resultados da quantificação da infiltração macrofágica no interstício renal dos animais dos grupos ao longo do estudo. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão, “N” de cada grupo e como gráfico de barras, respectivamente.

Corroborando estudos anteriores, os animais submetidos à ablação renal de 5/6 apresentaram intensa atividade inflamatória no parênquima renal. Após 15 dias da indução da DRC, os animais do grupo Nx sem tratamento já apresentavam um

aumento numérico de macrófagos no interstício renal, que se tornou estatisticamente significativo após 30 dias de Nx.

A administração de Losartan e das CTmTA, em monoterapia, não foram capazes de reduzir estatisticamente este parâmetro. No entanto, quando os tratamentos foram associados, observou-se a normalização da infiltração macrófagica intersticial, caracterizada pela diferença estatística entre este grupo e o grupo sem tratamento, bem como pela semelhança entre os valores numéricos apresentados pelo grupo Nx+CTmTA+LOS 30d, quando comparados àqueles apresentados pelo grupo Sham.

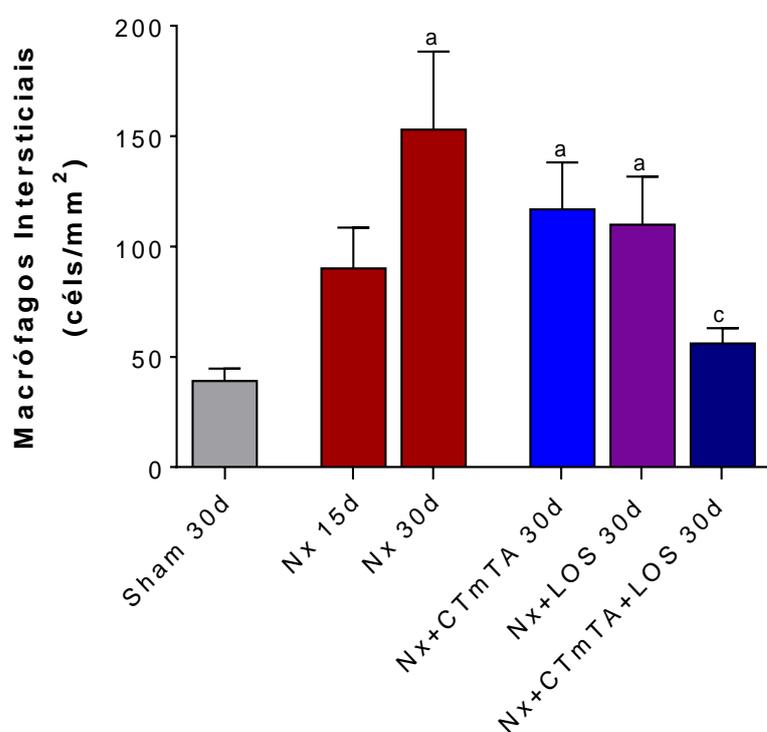


Figura 32 – Infiltração Macrófagica Intersticial (células/mm²) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.15 Infiltração Linfocitária Intersticial

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada para detecção e avaliação da infiltração de linfócitos T CD3+ no interstício renal dos animais dos diferentes grupos experimentais. A **Figura 33** representa microfotografias ilustrativas dos padrões de marcação observados nos animais dos seis grupos do estudo.

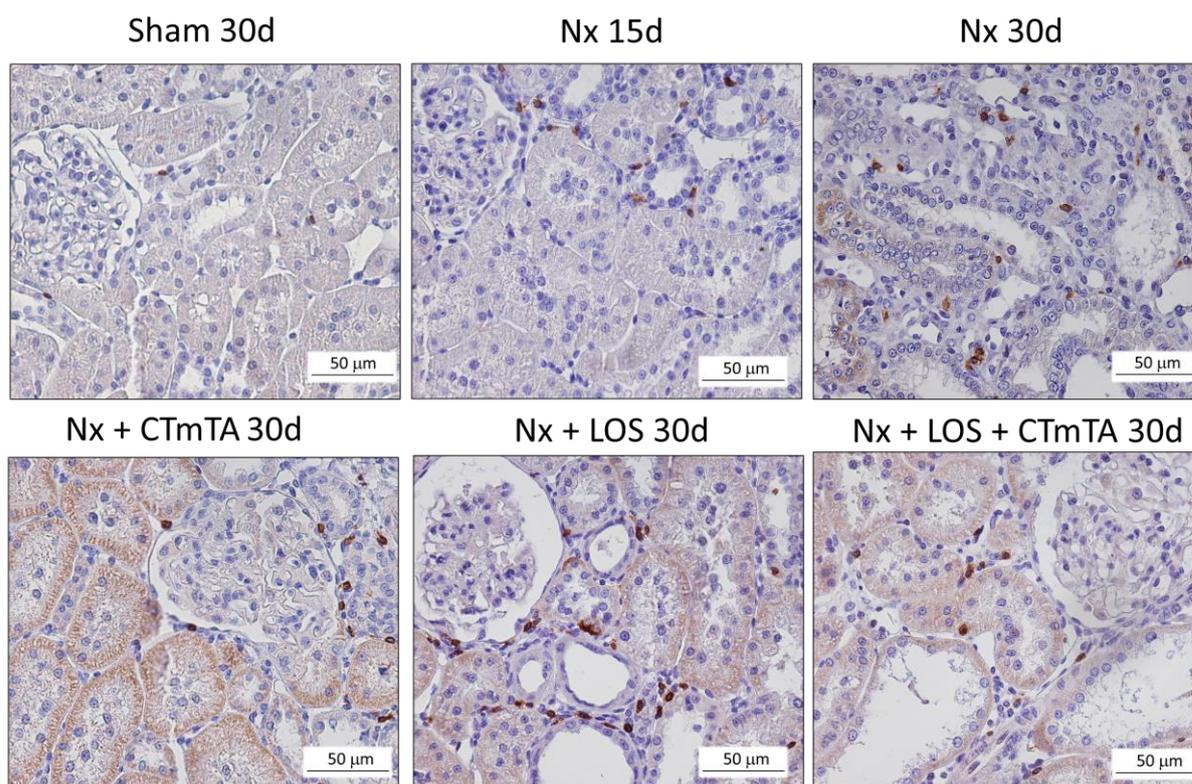


Figura 33 - Microfotografias ilustrativas de lâminas de Imuno-histoquímica para detecção de linfócitos no interstício renal dos animais dos diferentes grupos experimentais

Podemos observar a análise da infiltração intersticial de linfócitos T no córtex renal dos animais dos diferentes grupos experimentais na **Tabela 3** como média \pm erro padrão e “N” e no gráfico de barras na **Figura 34**.

Os animais submetidos à ablação renal de 5/6 apresentaram intensa atividade inflamatória no parênquima renal. Após 15 dias da indução da DRC, os animais do grupo Nx sem tratamento já apresentavam um aumento significativo de linfócitos T no interstício renal, sendo importante ressaltar que este parâmetro praticamente triplicou numericamente no grupo mantido sem tratamento até 30 dias após a indução da DRC.

Nenhum dos tratamentos foi eficaz em reduzir significativamente a presença de linfócitos no interstício renal, embora uma redução numérica possa ser observada nos grupos tratados, quando comparados ao grupo sem qualquer tratamento, sendo esta, mais evidente no grupo Nx+CTmTA+LOS.

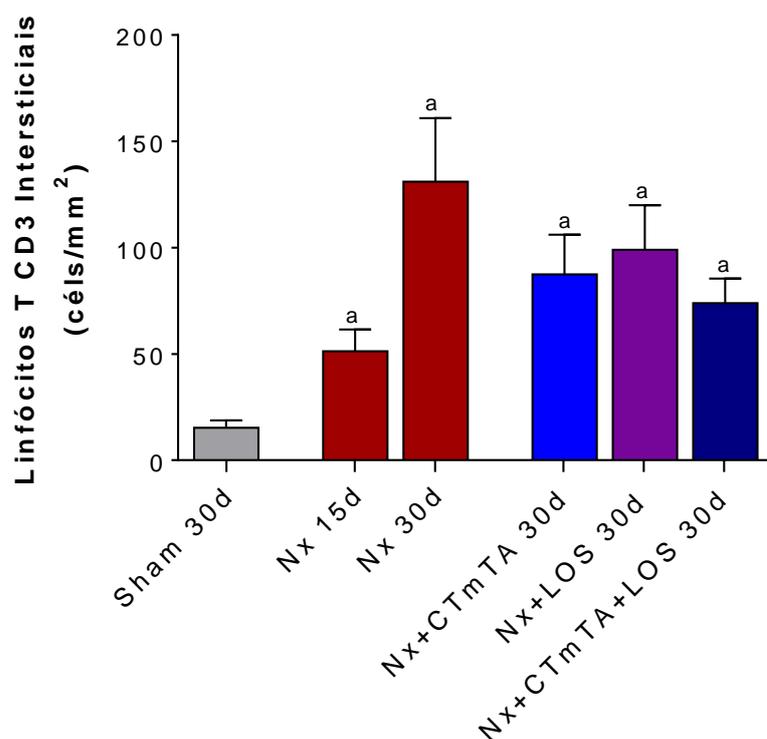


Figura 34 – Infiltração Linfocitária Intersticial (cél/m²) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.16 Proliferação Celular

A **Figura 35** traz microfotografias ilustrativas de lâminas histológicas de animais dos diferentes grupos experimentais, submetidas à reação de imuno-histoquímica para detecção de células intersticiais em proliferação, através da positividade para PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). As lâminas foram analisadas sob aumento final de 400x.

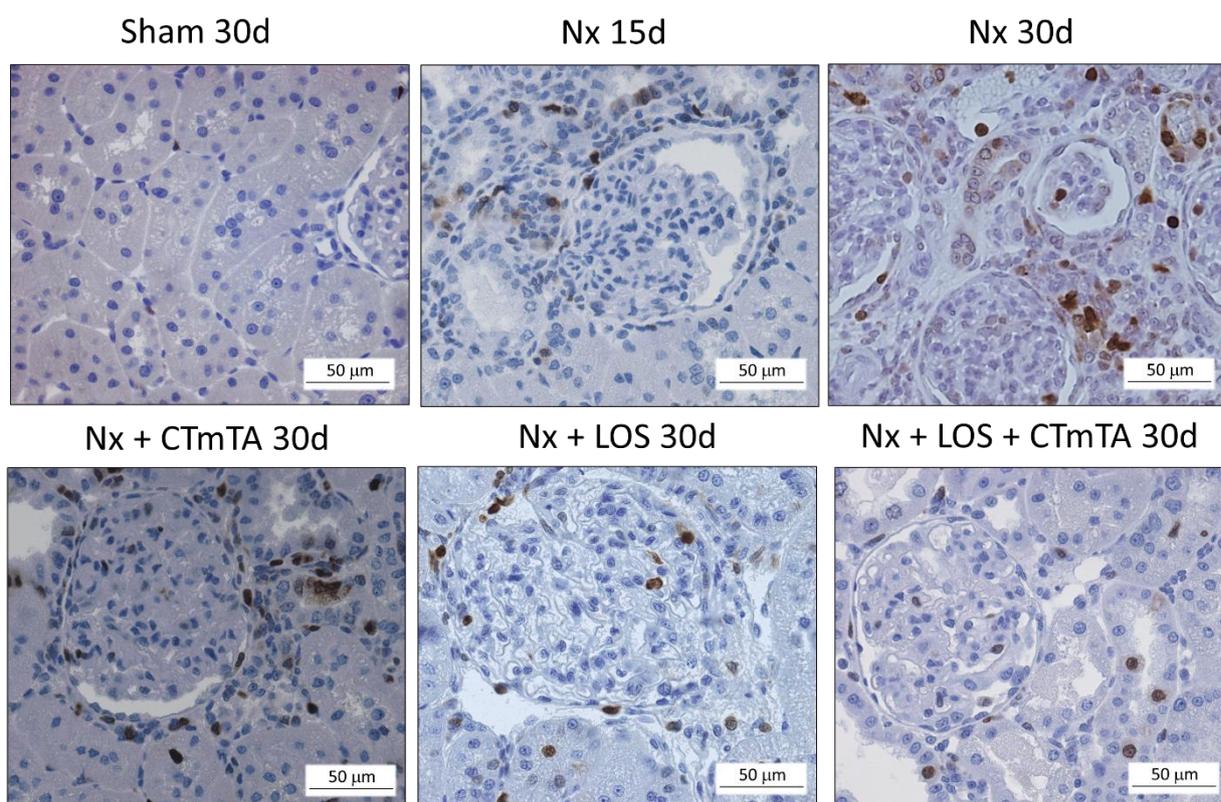


Figura 35 - Microfotografias ilustrativas de lâminas de Imuno-histoquímica para avaliação da Proliferação Celular no córtex renal dos animais dos diferentes grupos experimentais

Os resultados detalhados da proliferação celular no interstício do córtex renal dos animais dos diferentes grupos foram apresentados como média \pm erro padrão e “N” na **Tabela 3** e como gráfico de barras na **Figura 36**. O gráfico apresentado mostra a quantificação da proliferação celular no interstício renal dos animais dos diferentes grupos experimentais deste estudo.

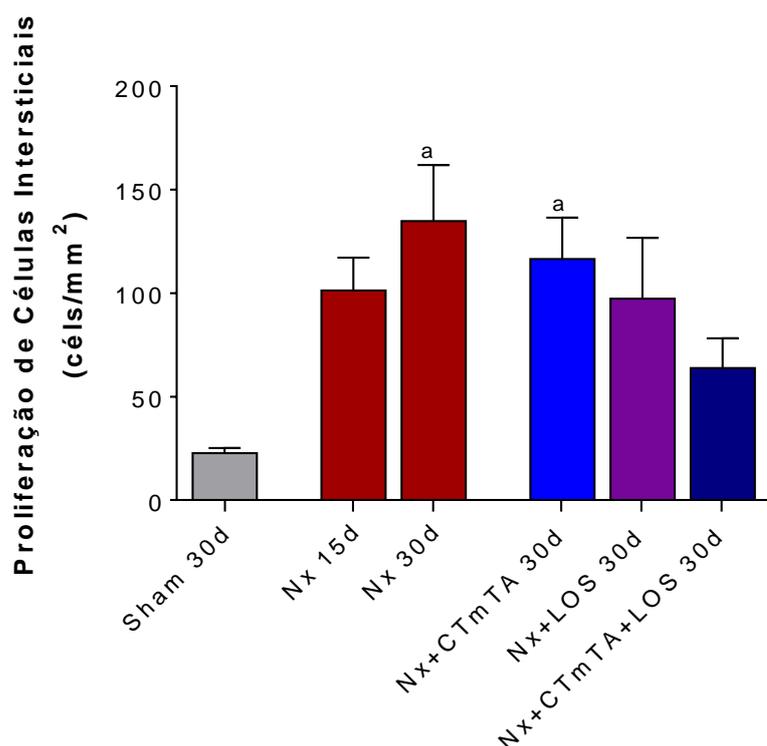


Figura 36 - Proliferação de células intersticiais (cél/m²) dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

Conforme demonstrado, os animais submetidos à ablação renal de 5/6 apresentaram intensa proliferação celular intersticial já aos 15 dias, que aumentou significativamente após 30 dias de Nx, provavelmente refletindo uma maior atividade inflamatória no parênquima renal. A aplicação das CTmTA em monoterapia não foi capaz de conter a progressão da proliferação celular no grupo Nx+CTmTA, enquanto que, o tratamento com Losartan levou a uma sutil redução deste parâmetro. Surpreendentemente, a associação desse fármaco com a aplicação subcapsular de CTmTA intensificou a redução da proliferação celular intersticial no grupo Nx+LOS+CTmTA.

4.17 Expressão da Proteína ZO1

Para a avaliação da porcentagem da área glomerular ocupada pela proteína ZO1, as lâminas de tecido renal dos animais dos diferentes grupos experimentais foram coradas através da técnica de imuno-histoquímica e analisadas sob aumento final de 400x. A **Figura 37** traz microfotografias ilustrativas dos padrões de coloração observados nos animais dos seis grupos do estudo.

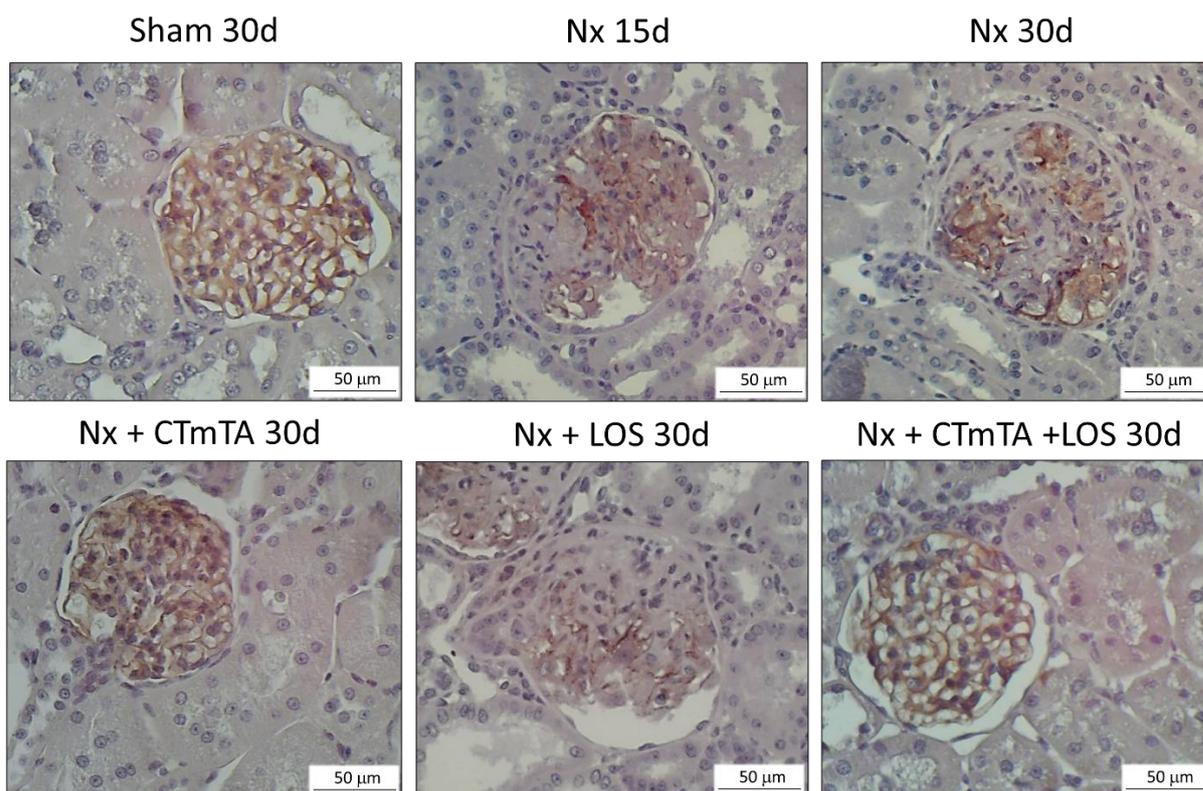


Figura 37 - Microfotografias ilustrativas de lâminas de Imuno-histoquímica para detecção de ZO1 nos glomérulos renais dos animais dos diferentes grupos experimentais

Os resultados da porcentagem das áreas glomerulares ocupadas pela proteína ZO1 nos animais dos diferentes grupos foram apresentados como média \pm erro padrão e "N" na **Tabela 3** e como gráfico de barras na **Figura 38**.

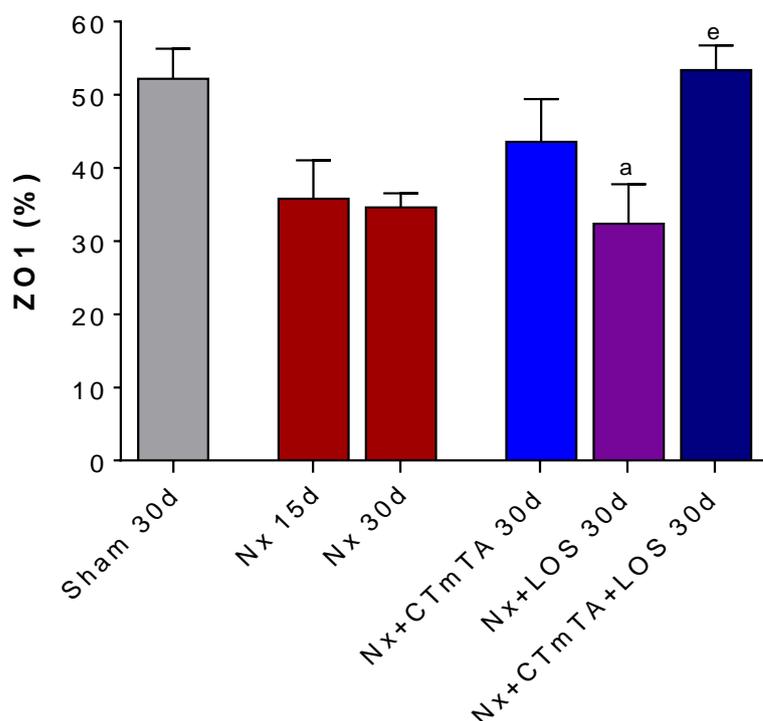


Figura 38 – Porcentagem de área glomerular ocupada por ZO1 (%) após 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

Conforme demonstrado, os animais submetidos a ablação renal de 5/6 já apresentavam porcentagem da área glomerular ocupada por ZO1 numericamente reduzida após 15 dias da indução da DRC, quando comparados ao grupo Sham. Essa porcentagem manteve-se baixa até o término do estudo no grupo Nx sem tratamento, bem como, nos animais tratados exclusivamente com Losartan. Surpreendentemente, os grupos tratados com CTmTA em monoterapia, ou em associação com Losartan, apresentaram porcentagem de ZO1 glomerular superior à observada nos demais grupos de animais submetidos à ablação renal, com destaque especial para o grupo associação, no qual a porcentagem de ZO1 glomerular manteve-se semelhante à observada nos animais Sham.

4.18 Análises de Expressão Gênica

Os resultados da análise da expressão gênica de mediadores pró e anti-inflamatórios como as citocinas e interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-4 e IL-6 e IL-10 foram apresentados como média \pm erro padrão e “N” na **Tabela 4**.

4.18.1 IL-1- β

A expressão gênica do IL-1 β foi analisada pela técnica de RT-q PCR, conforme demonstrado no gráfico de barras apresentado na **Figura 39**. Os animais submetidos à ablação renal de 5/6 apresentaram intensa expressão gênica de IL-1 β , já aos 15 dias (2,3x em relação a expressão nos animais Sham), que aumentou numericamente após 30 dias de Nx (2,7x em relação ao Sham), provavelmente refletindo uma maior atividade inflamatória no parênquima renal. Todos os tratamentos empregados reduziram apenas sutilmente a expressão deste gene (Nx+CTmTA 30d: 2,1x; Nx+LOS 30d: 2,0x e Nx+CTmTA+LOS 30d: 2,3x em relação ao Sham).

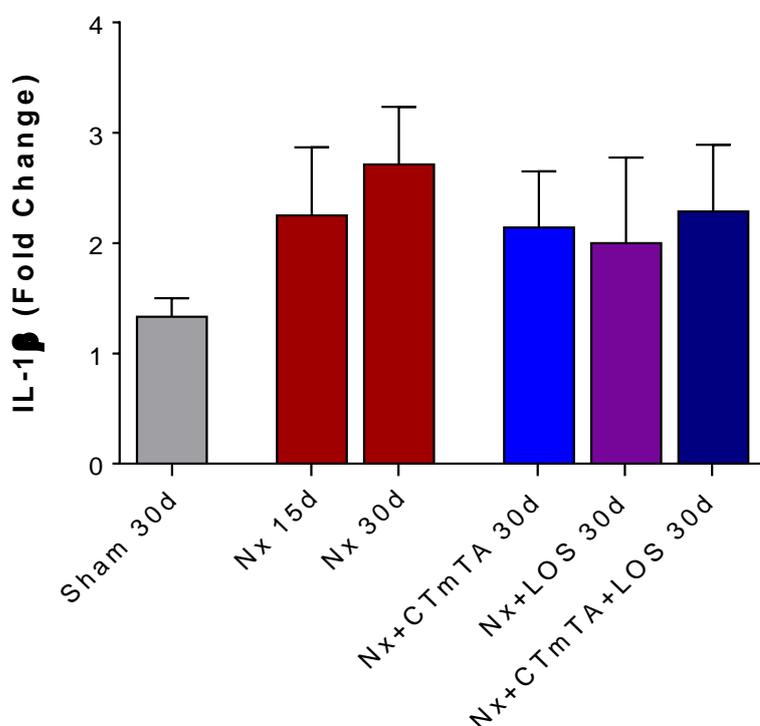


Figura 39 – Expressão gênica de IL-1 β dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: p<0,05 vs. Sham 30d; b: p<0,05 vs. Nx 15d; c: p<0,05 vs. Nx 30d; d: p<0,05 vs. Nx+CTmTA 30d; e: p<0,05 vs. Nx+LOS 30d)

4.18.2 IL-2

Aos 15 dias de ablação renal, conforme observamos no gráfico de barras da **Figura 40**, os animais já apresentavam um aumento exuberante da expressão gênica de IL-2 (4,9x em relação ao Sham), que se tornou significativo aos 30 dias de cirurgia (6,0x em relação ao Sham). Os grupos tratados com a inoculação subcapsular de CTmTA, tanto em monoterapia quanto em associação, apresentaram valores de expressão gênica superiores aos observados nos grupos que não receberam quaisquer dos tratamentos (7,8x em relação ao Sham, nos animais Nx+CTmTA 30d e 8,0x em relação ao Sham, no grupo Nx+CTmTA+LOS 30d). Os animais tratados apenas com LOS apresentaram expressão gênica de IL-2 semelhante àquela apresentada no grupo Nx 30d (5,8x em relação ao Sham).

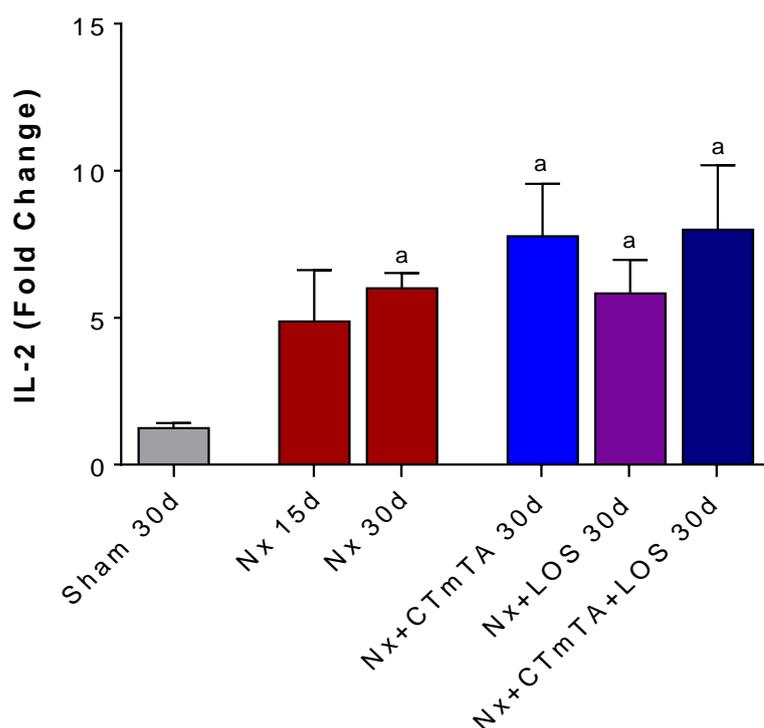


Figura 40 – Expressão gênica de IL-2 dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.18.3 IL-4

A expressão gênica da IL-4 seguiu tendência semelhante à apresentada pela IL-2. Conforme podemos observar no gráfico de barras da **Figura 41**, aos 15 dias de Nx a expressão de IL-4 já se apresentava aumentada (3,3x em relação ao Sham), quando comparada ao grupo controle. Este aumento se manteve até o final do estudo nos animais que não receberam a inoculação subcapsular de CTmTA. Maior expressão de IL-4 pôde ser observada nos grupos de animais que receberam a administração de CTmTA, tanto em monoterapia, quanto em associação ao LOS. (Nx+CTmTA 30d: 3,9x; Nx+LOS 30d: 2,3x e Nx+CTmTA+LOS 30d: 4,3x em relação ao Sham).

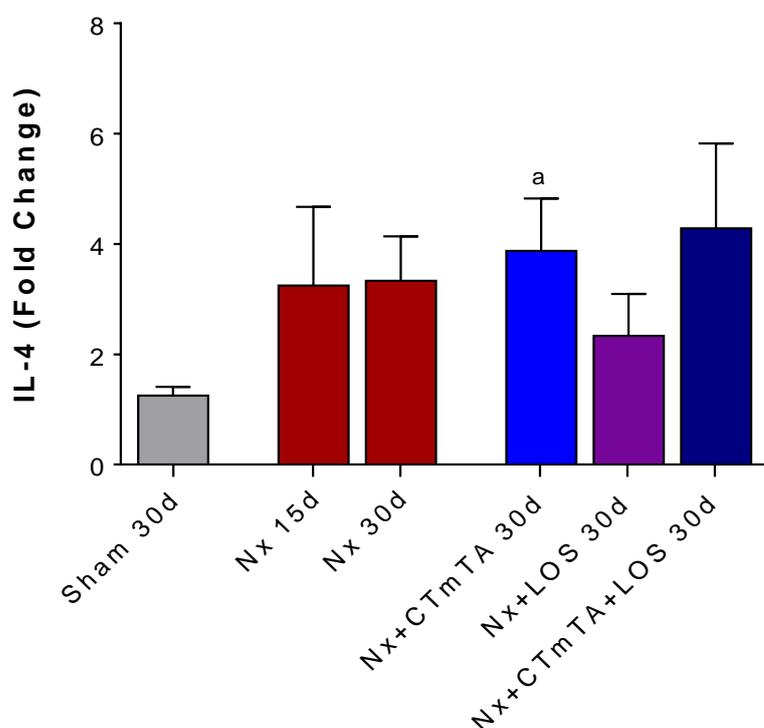


Figura 41 – Expressão gênica de IL-4 dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.18.4 IL-6

A **Figura 42** traz um gráfico de barras no qual podemos observar os valores de expressão do gene IL-6. A superexpressão deste gene, notoriamente observada nos animais Nx sem tratamento, já aos 15 dias de cirurgia (13,0x em relação ao Sham), se manteve semelhante até o término do período de estudo. Nenhuma das monoterapias parece ter sido eficaz em conter a progressão destes valores. Todavia, no grupo que recebeu a associação dos tratamentos, observamos uma redução significativa da expressão deste gene, refletindo uma possível queda na atividade inflamatória no parênquima renal destes animais. (Nx+CTmTA 30d: 8,9x; Nx+LOS 30d: 8,7x e Nx+CTmTA+LOS 30d: 2,1x em relação ao Sham).

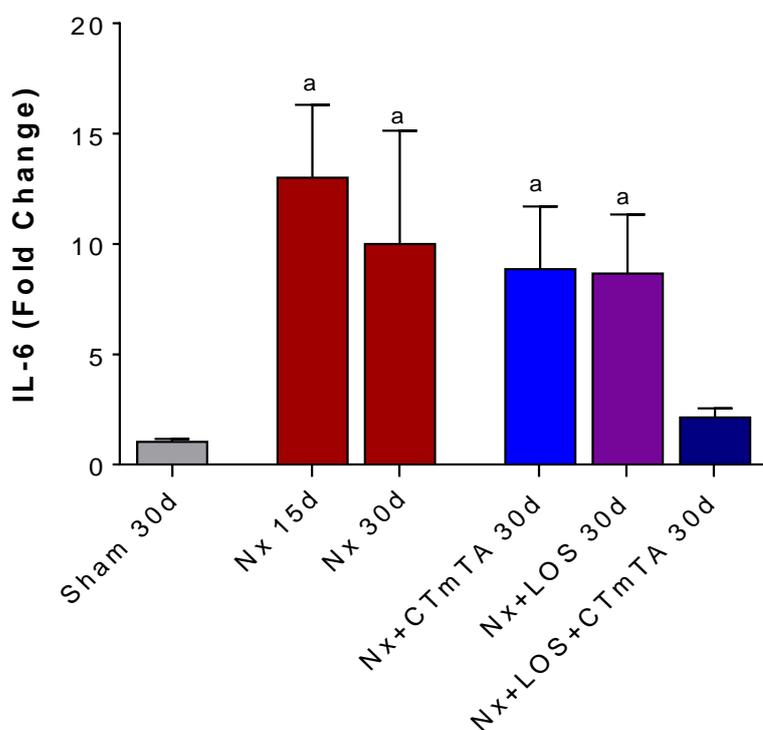


Figura 42 – Expressão gênica de IL-6 dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

4.18.5 IL-10

Os resultados detalhados da expressão do gene IL-10, nos diferentes grupos experimentais, foram apresentados como gráfico de barras na **Figura 43**. Conforme constatado, os animais Nx apresentaram um pico de superexpressão de IL-10, aos 15 dias após a ablação renal (5,6x em relação ao Sham). Aos 30 dias de cirurgia, os valores de expressão gênica de IL-10 mantiveram-se elevados em relação ao grupo Sham tanto nos grupos de animais tratados, como naqueles que não receberam tratamento algum, no entanto, esses valores foram numericamente muito inferiores ao valor observado aos 15 dias. (Nx 30d: 2,2; Nx+CTmTA 30d: 2,7x; Nx+LOS 30d: 2,0x e Nx+CTmTA+LOS 30d: 2,6x em relação ao Sham).

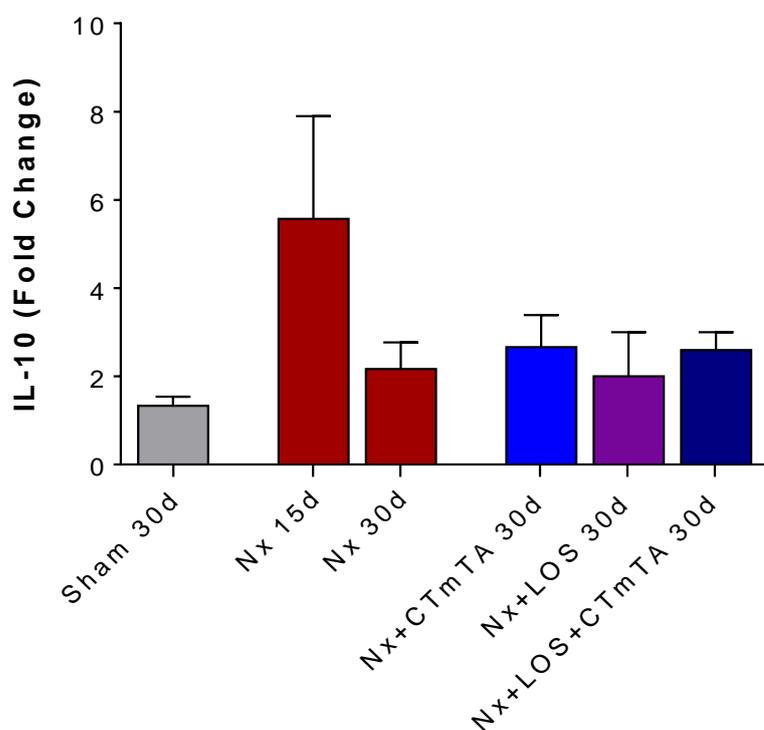


Figura 43 – Expressão gênica de IL-10 dos animais aos 30 dias de ablação renal de 5/6 (a: $p < 0,05$ vs. Sham 30d; b: $p < 0,05$ vs. Nx 15d; c: $p < 0,05$ vs. Nx 30d; d: $p < 0,05$ vs. Nx+CTmTA 30d; e: $p < 0,05$ vs. Nx+LOS 30d)

Tabela 2 – Parâmetros de acompanhamento sistêmicos e renais dos animais dos diferentes grupos no tempo zero, após 15 e 30 dias da indução da DRC. a: p<0,05 vs. respectivo Sham, b: p<0,05 vs. respectivo Nx, c: p<0,05 vs. respectivo Nx+CTmTA d: p<0,05 vs. respectivo Nx+LOS

	SHAM			Nx			Nx+CTmTA			Nx+LOS			Nx+CTmTA+LOS		
	Tempo zero	15d	30d	Tempo zero	15d	30d	Tempo zero	15d	30d	Tempo zero	15d	30d	Tempo zero	15d	30d
PC (g)	249±5	328±14	356±12	242±5	260±7 ^a	304±6 ^a	237±5	252±7 ^a	286±11 ^a	232±4	254±5 ^a	289±9 ^a	234±6	254±5 ^a	296±5 ^a
VolU (ml)	12±1	17±2	19±2	12±1	40±3 ^a	43±4 ^a	13±1	36±4 ^a	39±4 ^a	13±1	38±3 ^a	42±5 ^a	11±1	42±3 ^a	38±3 ^a
PSC (mmHg)	130±3	133±3	140±2	130±3	178±8 ^a	205±6 ^a	130±3	173±5 ^a	203±8 ^a	130±2	185±3 ^a	174±9 ^{abc}	130±4	179±5 ^a	163±9 ^{bc}
PtnU (mg/24h)	18±2	22±2	22±2	22±3	91±17 ^a	196±41 ^a	21±2	90±17 ^a	118±30 ^a	14±2	81±11 ^a	110±46 ^a	16±2	80±12 ^a	47±10 ^b
AlbU (mg/24h)	1±1	1±1	1±1	1±1	58±15 ^a	122±28 ^a	1±1	46±16 ^a	64±20 ^a	1±1	59±20 ^a	71±37 ^a	1±1	43±10 ^a	19±7 ^b

Tabela 3 – Parâmetros analisados ao final do estudo: Após 30 dias da indução da DRC.**a:** p<0,05 vs. Sham 30d; **b:** p<0,05 vs. Nx 30d; **c:** p<0,05 vs. Nx+CTmTA 30d; **d:** p<0,05 vs. Nx+LOS 30d

	SHAM 30d (n=13)	Nx 30d (n=14)	Nx+CTmTA 30d (n=15)	Nx + LOS 30d (n=12)	Nx+LOS+CTmTA 30d (n=15)
Sobrevida (%)	100%	92%	93%	100%	100%
Creat (mg/dL)	0,65±0,03	0,97±0,11	1,17±0,15 ^a	0,82±0,06	0,83±0,06
Clearance de Creat (mL/min/357cm ²)	31±3	23±5	16±2 ^a	35±10	24±2
Ureia (mg/dL)	51±4	88±8 ^a	101±15 ^a	84±7 ^a	82±4 ^a
Hipertrofia Renal (g)	3±0	5±0 ^a	5±0 ^a	2±0 ^a	1±0 ^a
GS (%)	7±3	32±6 ^a	22±8	32±5 ^a	15±4
ZO1 (%)	52±4	35±2	44±6	32±5 ^a	53±3 ^c
INT (%)	1,0±0,2	5,8±1,4 ^a	3,3±0,9 ^a	2,4±0,4	2,5±0,5 ^a
a-SMA (%)	0,9±0,1	3,5±0,5 ^a	2,8±0,5 ^a	2,8±0,3 ^a	2,7±0,3 ^a
CD68 (cel/mm ²)	39±6	153±35 ^a	102±17 ^a	110±22 ^a	56±7 ^c
CD3 (cel/mm ²)	15±3	131±30 ^a	88±19 ^a	99±21 ^a	74±12 ^a
PCNA Int (cel/mm ²)	23±3	135±27 ^a	117±20 ^a	97±29	64±14

Tabela 4 – Análise da expressão gênica de mediadores pró e anti-inflamatórios: Após 30 dias da indução da DRC.

a: p<0,05 vs. Sham 30d; **b:** p<0,05 vs. Nx 30d; **c:** p<0,05 vs. Nx+CTmTA 30d; **d:** p<0,05 vs. Nx+LOS 30d

	SHAM 30d (n=8)	Nx 30d (n=8)	Nx+CTmTA 30d (n=8)	Nx + LOS 30d (n=8)	Nx+LOS+CTmTA 30d (n=8)
IL-1β (fold change)	1,1 \pm 0,2	3,1 \pm 0,7	1,8 \pm 0,5	2,1 \pm 0,6	2,6 \pm 0,6
IL-2 (fold change)	1,4 \pm 0,5	12,4 \pm 7,6 ^a	6,4 \pm 1,4 ^a	4,9 \pm 1,0	9,2 \pm 2,3 ^a
IL-4 (fold change)	1,1 \pm 0,2	4,7 \pm 1,3	4,1 \pm 1,0	3,3 \pm 1,0	7,1 \pm 2,0 ^a
IL-6 (fold change)	1,0 \pm 0,1	9,5 \pm 3,9 ^a	11,8 \pm 4,6 ^a	8,3 \pm 2,4 ^a	2,6 \pm 0,4
IL-10 (fold change)	1,3 \pm 0,3	5,0 \pm 2,8	3,0 \pm 0,9	1,8 \pm 1,0	3,4 \pm 1,2

5. DISCUSSÃO

O relevante aumento mundial da incidência de DRC, concomitante ao caráter progressivo e altamente debilitante dessa doença, ligado a inexistência, até o presente momento, de um tratamento realmente eficaz para impedir o avanço da perda de função renal, têm motivado a comunidade científica a desenvolver estudos pré-clínicos experimentais em busca de alternativas terapêuticas que possam ser associadas às práticas já empregadas, a fim de se potencializar os tratamentos atualmente existentes [1,2].

A ablação renal de 5/6 (Nx), modelo experimental adotado neste estudo, é um dos modelos de DRC empregados atualmente para a pesquisa por novas estratégias terapêuticas para a contenção da progressão da doença, visto que este modelo mimetiza muito bem a DRC humana, uma vez que promove alterações em diversos parâmetros clínico-laboratoriais, tais como perda de peso, desenvolvimento de hipertensão arterial, perda da seletividade da barreira de filtração glomerular, retenção de toxinas urêmicas, alterações histológicas do parênquima renal e evolução para perda de função do órgão.

No presente estudo, conforme esperado, a taxa de mortalidade entre os animais Nx que não receberam nenhum tratamento foi de 8% (92% de sobrevida); enquanto que, os animais tratados com Losartan, em monoterapia ou em associação à inoculação de CTmTA, apresentaram 100% de sobrevida, provavelmente em decorrência da ação anti-hipertensiva deste medicamento, resultado da inibição farmacológica dos efeitos biológicos da AII. Sabidamente os eventos cardiovasculares são os principais responsáveis pela alta mortalidade dos pacientes com DRC, estando esses diretamente relacionados à hipertensão arterial. O bloqueio do SRAA através do emprego de antagonistas do receptor AT1 (AT1-R), como o Losartan, atenua a hipertensão arterial sistêmica, contribuindo assim para uma menor incidência de eventos cardiovasculares que poderiam levar à morte os animais submetidos ao modelo Nx.

Arias et al, demonstraram através de um estudo realizado com animais submetidos ao modelo experimental de ablação renal de 5/6, que o tratamento com Losartan levou a uma menor mortalidade desses animais, mesmo quando mantidos por longo período de estudo e apresentando DRC grave. A ação farmacológica de Losartan contribuiu para a diminuição das lesões renais e, conseqüentemente, para a maior sobrevida entre os animais tratados com este medicamento [14].

Curiosamente, no grupo de animais que recebeu a inoculação subcapsular de CTmTA em monoterapia, ou seja, sem a administração de nenhum fármaco anti-hipertensivo, a mortalidade atingiu uma taxa de apenas 7%, 1% a menos do que os animais mantidos sem nenhum tipo de tratamento. Esse efeito não se deveu à redução de pressão arterial, uma vez que os animais do grupo Nx+CTmTA apresentaram-se tão hipertensos quanto os animais do grupo Nx sem tratamento.

Gupta e colaboradores observaram efeitos semelhantes na manutenção da sobrevida de camundongos em um interessante estudo versado sobre os mecanismos protetores das CTm em lesões pulmonares. De acordo com os autores, a administração de CTmMO no espaço aéreo pulmonar de camundongos acometidos por lesão pulmonar aguda, exerceu efeito anti-inflamatório, contribuindo para o aumento da taxa de sobrevida destes animais [49]. Mantidas as devidas ressalvas e, embora ainda não tenhamos todos os elementos para afirmar com precisão, acreditamos que a menor mortalidade observada no grupo de animais Nx tratados com CTmTA possa estar relacionada á ação imunomoduladora exercida por estas células.

Corroborando o observado na prática clínica em pacientes com função renal significativamente reduzida, conforme mencionado anteriormente, os animais Nx desenvolveram grave hipertensão arterial, que pode ser justificada através da teoria Guytoniana da natriurese pressórica, segundo a qual, o surgimento e a manutenção de hipertensão sistêmica nos pacientes com DRC ocorre devido a dois eventos fisiopatológicos complementares: A redução do número de néfrons e conseqüente queda na taxa de excreção renal de sódio e água ocasiona retenção, levando ao desenvolvimento de uma hipervolemia transitória e aumento temporário do débito cardíaco. Essa situação deflagra uma resposta fisiológica a fim de corrigir a

hipervolemia; o organismo aciona uma cascata de mecanismos de auto-regulação tecidual, que cursa com a elevação da resistência vascular periférica, levando ao estabelecimento de hipertensão arterial sistêmica de caráter permanente. Sob alta pressão, restitui-se minimamente o ritmo de filtração glomerular, que apesar de continuar reduzido em relação ao estado normal, tende a regularizar o equilíbrio da excreção de íons pelos rins [50].

No presente protocolo, a inoculação de CTmTA em monoterapia não foi capaz de reduzir a hipertensão arterial decorrente da doença, nos animais do grupo Nx+CTmTA, provavelmente por se tratar de um quadro já muito avançado de DRG. Conforme esperado, a redução da pressão arterial foi obtida, embora apenas parcialmente, diante da administração de Losartan nos grupos Nx+LOS e NX+LOS+CTmTA. Surpreendentemente, a associação dos tratamentos promoveu redução ainda mais pronunciada da hipertensão arterial que, aos 30 dias de acompanhamento, não foi diferente do ponto de vista estatístico, entre os grupos Sham e NX+LOS+CTmTA. Uma redução significativa na hipertensão apresentada pelos animais Nx com a aplicação subcapsular de CTm já havia sido observada por Cavaglieri e colaboradores [43] em publicações anteriores, embora a gravidade da nefropatia apresentada pelos animais utilizados por aquele grupo fosse menor do que a observada no presente estudo. Acredita-se que a presença de CTm no microambiente renal possa ter levado a alterações favoráveis no equilíbrio entre citocinas e mediadores de efeitos vasoconstritores e vasodilatadores, potencializando a ação anti-hipertensiva de Losartan.

Confirmando dados observados previamente, os animais submetidos a ablação renal de 5/6 apresentaram peso corpóreo significativamente inferior àquele observado nos animais Sham, mimetizando o observado na prática clínica, uma vez que sabe-se que pacientes renais crônicos graves apresentam perda de peso e sarcopenia, e que a fisiopatologia da desnutrição proteico-calórica em pacientes renais é complexa e envolve um grande número de fatores [51]. Outro achado importante nos animais Nx foi a poliúria significativa, provavelmente associada às lesões tubulares apresentadas neste modelo experimental [12]. Nenhuma dessas alterações patológicas parece ter sido atenuada pelos tratamentos testados, tanto as monoterapias como a associação de LOS+CTmTA.

A proteinúria, parâmetro patológico comumente observado nos pacientes nefropatas, também foi avaliada no presente estudo. Este fenômeno em geral denota a presença de lesão glomerular, decorrente da perda da seletividade da barreira de filtração glomerular, caracterizada pela presença de lesões em uma ou mais das camadas que compõe esta barreira, o que ocasiona o extravasamento de macromoléculas, como as proteínas, para o ultrafiltrado glomerular e, conseqüentemente para a urina [5].

Mimetizando o observado na clínica, nossos animais submetidos à ablação renal de 5/6 já apresentavam significativa perda de proteínas pela urina após 15 dias da indução da DRC. Quando mantidos sem tratamento, esses animais passaram a exibir franca progressão da proteinúria (aumento de aproximadamente 100%) entre os pontos 15 e 30 dias, isto é, praticamente dobraram o valor de proteinúria entre esses dois pontos de análise. Dentre as principais proteínas presentes na urina dos animais submetidos à ablação renal, está a albumina; proteína plasmática mais abundante em condições fisiológicas. Conseqüentemente, os dados de albuminúria dos animais Nx seguiram a tendência dos dados da proteinúria. O grupo Nx já exibia aos 15 dias valores significativos de albuminúria, que progrediu em cerca de 75% com o passar do tempo, até os 30 dias de indução da DRC.

No modelo Nx, a perda da seletividade da barreira de filtração glomerular está relacionada a múltiplos fatores, dentre os quais é possível destacar a hipertensão arterial grave e persistente, que acarreta conseqüente hipertensão glomerular e lesão endotelial, a perda do número de néfrons, que leva à hipertrofia dos glomérulos remanescentes, o aumento do ritmo de filtração glomerular individual e, por fim, o desenvolvimento de um processo inflamatório crônico no parênquima renal, com migração de leucócitos e aumento da secreção de matriz extracelular nos glomérulos.

A administração de ambas as monoterapias promoveu a desaceleração da progressão da proteinúria e da albuminúria nos animais dos grupos Nx+CTmTA e Nx+LOS, em relação aos animais Nx mantidos sem tratamento, sugerindo que tais terapias tenham protegido os glomérulos desses animais da evolução da nefropatia. Achados semelhantes foram demonstrados por Cavaglieri e colaboradores [15], e por Arias e colaboradores [14] todavia, os mecanismos envolvidos na redução destes

parâmetros ainda não estão completamente elucidados e podem estar relacionadas a redução da lesão renal como um todo, à melhora dos fatores hemodinâmicos ou à melhora da inflamação local.

Surpreendentemente, nos animais tratados com a associação da terapia oral com Losartan e uma aplicação subcapsular de 2×10^6 CTmTA, observamos uma significativa regressão da proteinúria e da albuminúria, isto é, os animais do grupo Nx+CTmTA+LOS 30d apresentaram aproximadamente 30% menos proteinúria e 25% menos albuminúria com relação à este mesmo grupo antes do início dos tratamentos, aos 15d. Estes dados sugerem que as CTmTA tenham desempenhado um papel renoprotetor sobre a barreira de filtração glomerular, e que esta renoproteção é maximizada quando associada a administração oral do Losartan, minimizando assim, as lesões clássicas deste modelo. É importante ressaltar, que tais resultados foram bastante relevantes, sobretudo por que a proteinúria e principalmente a albuminúria são os fatores clínico-laboratoriais mais valorizados na avaliação da progressão da DRC em humanos.

Sabe-se que elevados níveis de albuminúria são potencialmente perigosos para pacientes acometidos por DRC, dada a importância da permanência de níveis séricos elevados de albumina para a manutenção da pressão osmótica, transporte de hormônios, equilíbrio ácido-base e para a homeostase de maneira geral. Uma pesquisa multicêntrica, que estudou as variáveis relacionadas com a sobrevida dos pacientes em diálise, mostrou que níveis de albumina sérica inferiores a 2,5 g/dL estavam relacionados a um maior risco de mortalidade, tanto na população em hemodiálise como em diálise peritoneal [52], além disso, diversos estudos têm demonstrado que pacientes com concentrações de albumina sérica acima de 4,0 g/dL apresentam índices de morbidade e mortalidade efetivamente menores [53].

Ratificando dados previamente publicados por este e outros grupos de pesquisa, os animais submetidos ao modelo experimental de ablação renal de 5/6 apresentaram retenção sérica de creatinina e ureia, características da perda da capacidade de depuração das toxinas urêmicas e, conseqüente, diminuição da função renal. Aparentemente, não foram observados efeitos renoprotetores da inoculação de CTmTA, nem do tratamento com Losartan sobre esses parâmetros, o que foi

evidenciado pelos baixos valores do clearance de creatinina, nos animais Nx, quando comparados ao grupo controle. Todavia, faz-se necessário ressaltar, que a concentração de creatinina sérica é uma medida de baixa sensibilidade e especificidade para detecção de lesão renal em roedores, uma vez que esses animais secretam creatinina ativamente pelos túbulos, o que faz com que a eliminação da mesma pela urina não reflita verdadeiramente a filtração glomerular. [54-56].

Ainda em consonância com o esperado, observou-se uma diferença significativa entre o peso renal dos animais dos grupos submetidos a ablação renal de 5/6 quando comparados aos animais do grupo Sham. Possivelmente esse aumento do peso renal nos animais submetidos ao modelo de DRC ocorreu em decorrência da hipertrofia da massa renal remanescente [57], a qual se manteve presente em todos os animais Nx, independentemente da administração de qualquer tratamento.

Sabe-se que o desenvolvimento de um processo inflamatório no parênquima renal é um mecanismo fisiopatológico bastante comum a uma série de nefropatias humanas, independentemente de sua etiologia, bem como a inúmeros modelos experimentais de DRC, incluindo o modelo Nx. Através das análises histológicas observamos uma perda significativa da arquitetura renal típica nos animais submetidos ao modelo de ablação renal de 5/6, caracterizada por comprometimento estrutural glomerular e tubulointersticial.

Discute-se que, fatores não patogênicos, tais como; a exposição dos capilares glomerulares à altas concentrações de glicose (em casos de nefropatia diabética ou em modelos experimentais que simulam tal condição) ou à elevada pressão hidrostática, poderiam servir como estímulo para o desenvolvimento de reações imunológicas glomerulares, com migração leucocitária, aumento da síntese e deposição de matriz mesangial, desenvolvimento de esclerose glomerular, comprometimento endotelial e perda de podócitos [58,59].

Aos 15 dias de Nx, os animais já apresentavam elevada porcentagem de esclerose glomerular, com redução da superfície de filtração glomerular e aparecimento de adesões do tufo glomerular à cápsula de Bowman (sinéquias). Tais achados tornaram-se ainda mais pronunciados após 30 dias da indução da DRC,

tendo portanto progredido significativamente durante o período de estudo. Os fatores que ocasionam o desenvolvimento de esclerose glomerular também podem levar a hipertensão arterial persistente, ao desenvolvimento de hipertensão glomerular e a inflamação local.

O tratamento com CTmTA em monoterapia, ou em associação ao Losartan, conteve de maneira significativa a progressão da porcentagem de esclerose glomerular nos animais dos grupos Nx+CTmTA e Nx+CTmTA+LOS, com especial destaque para o grupo que recebeu a associação das terapias. Neste último, a porcentagem de glomerulosclerose se manteve numericamente semelhante, ou até mesmo inferior, àquela observada nos animais Nx aos 15 dias. É importante ressaltar que os animais tratados exclusivamente com Losartan apresentaram valores de esclerose glomerular semelhantes àqueles observados nos animais mantidos sem tratamento, sugerindo que a inoculação subcapsular das CTmTA tenham exercido um importante papel antiinflamatório e anti-fibrótico local.

Acompanhando os achados histológicos avaliados com a coloração de PAS, nossas análises imuno-histoquímicas mostraram que a expressão glomerular da proteína constitutiva ZO1, que faz parte da membrana diafragmática, sendo uma das responsáveis pela manutenção da integridade da barreira de filtração glomerular, apresentou-se diminuída nos animais submetidos a ablação de 5/6, quando comparados aos animais Sham. Surpreendentemente, os tratamentos com CTmTA, em monoterapia ou em associação ao Losartan, recuperaram a expressão glomerular de ZO1, com especial destaque ao grupo Nx+CTmTA+LOS, que apresentou valores semelhantes aos observados nos animais controle. A saber, a monoterapia com Losartan não foi eficaz em normalizar a expressão glomerular de ZO1 nos animais Nx. Esses dados sugerem que uma interação sinérgica dos efeitos do bloqueio do AT1-R e da infusão local de CTmTA podem ter colaborado para a manutenção da integridade glomerular e, conseqüentemente, contido de maneira significativa o avanço da proteinúria nesses animais.

Conforme mencionado anteriormente, o compartimento cortical tubulointerstitial também é frequentemente palco de reações inflamatórias crônicas, relacionadas à fisiopatologia da DRC. A presença anômala de altas concentrações de

proteínas nos túbulos renais, bem como a lesão direta das células epiteliais tubulares devido à redução do número de néfrons e à necessidade de atuação compensatória dos néfrons remanescentes, poderiam atuar como desencadeantes de resposta inflamatória local, com perda de tolerância periférica aos componentes dos próprios tecidos, que se tornam antigênicos levando ao estabelecimento de um estado de inflamação crônica. Tal fenômeno se caracteriza por infiltrado leucocitário intersticial, aumento da proliferação celular e da síntese de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, ativação dos fibroblastos residentes e transdiferenciação dos mesmos em miofibroblastos, promovendo o aumento da síntese de matriz extracelular e desencadeando a fibrose [4,5,9].

A fibrose tecidual é, portanto, um processo patológico decorrente da inflamação prolongada. Muito presente em uma série de doenças crônico-degenerativas, dentre as quais, a DRC, a fibrose pode ser caracterizada pelo acúmulo de proteínas de matriz extracelular, especialmente o colágeno, no interstício dos tecidos, o que leva à perda de função do órgão acometido.

No presente estudo, os animais submetidos ao modelo de ablação renal de 5/6 apresentaram já aos 15 dias de acompanhamento, elevada infiltração macrófagica e linfocitária intersticial, aumento da proliferação celular, fibrose intersticial significativa e aumento expressivo da deposição tubulointersticial de α -SMA, evidenciando a presença de miofibroblastos corticais. A maioria desses parâmetros progrediu com o passar do tempo nos animais mantidos sem tratamento (Nx 30d), apontando para o agravamento da inflamação tecidual. Esses dados corroboram achados publicados previamente e confirmam o estabelecimento de um franco processo inflamatório e fibrogênico no córtex renal dos animais Nx.

Os animais Nx que receberam ambas as monoterapias (Nx+LOS e Nx+CTmTA) ou a associação dos tratamentos (Nx+CTmTA+LOS), mantiveram valores de porcentagem de fibrose intersticial numericamente semelhantes àqueles observados nos animais Nx 15d, mesmo após 30 dias da indução da DRC, evidenciando a eficácia na contenção da progressão da fibrose, independente do tratamento empregado. Curiosamente, o mesmo efeito não foi observado com relação

ao acúmulo túbulo-intersticial de α -SMA, que não sofreu grandes alterações mediante os tratamentos testados.

Quanto à infiltração intersticial do parênquima renal por macrófagos, notamos que a administração de Losartan e das CTmTA, em monoterapia, não foram capazes de reduzir estatisticamente este parâmetro. No entanto, quando os tratamentos foram associados, observou-se a completa normalização da infiltração macrofágica intersticial, evidenciada pela diferença estatística entre este grupo e o grupo sem tratamento, bem como pela semelhança entre os valores numéricos apresentados pelo grupo Nx+CTmTA+LOS 30d, quando comparados àqueles apresentados pelo grupo Sham. Este efeito pode ser justificado, de acordo com Melief e colaboradores, pela ação de citocinas imunomoduladoras liberadas pelas CTm no local da injúria. Além disso, ainda de acordo com esta autora, CTmTA seriam capazes de suprimir a proliferação de células sanguíneas mononucleares estimuladas, e inibir a diferenciação de células dendríticas imaturas derivadas de monócitos [60].

Com relação ao infiltrado linfocitário renal, observamos que nenhum dos tratamentos foi eficaz em reduzir significativamente a presença de linfócitos T no interstício renal dos animais Nx, que apresentaram aumento significativo deste parâmetro ao longo do estudo, embora uma redução numérica considerável possa ter sido observada nos grupos tratados, quando comparados ao grupo sem tratamento. Esta redução foi ainda mais evidente no grupo que recebeu a associação dos tratamentos, sinalizando a possível ação supressora exercida pelas CTmTA no local da lesão. Conforme revisto por Haddad, vários são os mecanismos biológicos através dos quais as CTm exerceriam atividade inibidora sobre os linfócitos T [63]. Glennie e colaboradores demonstraram que o contato entre as células tronco e os linfócitos T em um mesmo microambiente leva à paralisação do ciclo celular dessas últimas na fase G1, inibindo, portanto, a sua proliferação [64]. De acordo com Nicola e colaboradores, o contato célula-célula é essencial para um efeito supressor eficaz das CTm nos linfócitos T [65]. Sabe-se que estas células expressam integrinas e proteínas de adesão intercelular e vascular, podendo se ligar com eficiência às células T [66]. Diversos estudos que co-cultivaram CTm e células T, observaram que as primeiras se aderem aos linfócitos T ativados por um longo período [67] e, interessante-

constatou-se que os linfócitos T aderidos apresentam um fenótipo imunossupressor [68]. Além disso, outros autores demonstraram os fatores secretados pelas CTm seriam capazes de estimular a diferenciação de Th0 em linfócitos T reguladores (Tregs: CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺), células que apresentam a expressão superficial do receptor IL-2 (CD25) além de níveis elevados do fator de transcrição *forkhead box P3* (Foxp3), que se destacam pela capacidade de suprimir uma vasta gama células imunes, embora os mecanismos envolvidos neste processo ainda estejam sendo elucidados. [69,70].

Conforme previamente mencionado, a presença de intensa atividade proliferativa (PCNA) das células intersticiais do córtex renal dos animais submetidos à ablação renal de 5/6 foi observada já aos 15 dias, exacerbada significativamente aos 30 dias de cirurgia, provavelmente refletindo a intensificação da atividade inflamatória local. Observamos que o tratamento com Losartan promoveu alterações significativas neste parâmetro, porém, a associação desse fármaco com a aplicação subcapsular de CTmTA intensificou ainda mais a redução da proliferação celular intersticial no grupo Nx+LOS+CTmTA 30d, ratificando o que foi observado com relação a ocupação macrofágica no interstício renal dos grupos de animais submetidos a cirurgia de nefrectomia de 5/6 avaliados neste trabalho.

Os animais submetidos à ablação renal de 5/6 apresentaram intensa expressão gênica de 1L-1 β , corroborando dados observados pelo grupo de Taal, que constatou o aumento desta interleucina no tecido renal remanescente de ratos submetidos à nefrectomia subtotal [71]. De acordo com Vianna et al, a 1L-1 β destaca-se entre as interleucinas pró-inflamatórias relacionadas a fisiopatologia da DRC e, segundo Arend e colaboradores, também participa do processo de fibrose túbulo-intersticial. [72,73]. Diversos estudos demonstraram que o uso de um antagonista de receptor de IL-1 β atenua a lesão renal em modelo experimental de glomerulopatia crescêntica, indicando a participação da IL-1 β , na patogênese desta glomerulopatia [74,75].

No presente estudo, observamos que tanto a administração de CTmTA em associação ou não ao LOS quanto a administração deste fármaco em monoterapia, reduziram sutilmente a expressão deste gene, sinalizando uma possível ação anti-inflamatória dos tratamentos empregados.

Assim como no caso da IL-1 β , a expressão gênica de IL-2 apresentou-se elevada no parênquima dos animais submetidos a ablação renal de 5/6 aos 15 dias após a cirurgia, aumentando ainda mais, após 30 dias de ablação. A IL-2 é descrita classicamente como um mediador pró-inflamatório, com ação fundamental na expansão clonal de células T ativadas por antígenos [76]. Contrariando nossas expectativas, nos grupos que receberam a inoculação subcapsular de CTmTA, tanto em monoterapia quanto em associação ao LOS, os valores de expressão gênica de IL-2 foram superiores aos observados nos grupos Nx que não receberam as células. Este dado foi bastante surpreendente, uma vez que os animais tratados com as CTmTA apresentaram menores índices de inflamação renal, tais como menor infiltração macrófagica e linfocitária intersticial, menos proliferação de células intersticiais e menor porcentagem de fibrose.

De acordo com os achados de Malek e colaboradores, em estudo empregando camundongos transgênicos, quando os genes para IL-2 e/ou o seu receptor, IL-2R, são inativados, os camundongos *knockout* apresentam intensa proliferação linfocitária, morrendo precocemente. Uma possível explicação para este fenômeno seria que, mediante a ação da IL-2, as células T entram em expansão quando ativadas por antígenos, o que as torna muito sensíveis a apoptose, caso sejam reestimuladas com o mesmo antígeno novamente [77]. Este processo foi cunhado como “Morte Celular Induzida por Ativação” (*Activation-Induced Cell Death - AICD*) e foi proposto como o elemento falho nos animais *knockout* para IL-2/IL-2R e, portanto, responsável pelo aumento da proliferação de linfócitos e da hiper inflamação presente nesses animais [76]. Se considerarmos essa teoria, os achados do presente estudo poderiam indicar que a superexpressão de IL-2, estimulada pelo tratamento com CTmTA, teria colaborado para reduzir a inflamação renal, através do aumento do apoptose de linfócitos T pró-inflamatórios ativados por antígenos.

Outro achado interessante do grupo de Hu e colaboradores, utilizando camundongos diabéticos, demonstrou que a administração de baixas doses de IL-2, associada à Rapamicina, demonstrou eficácia em inibir a rejeição ao aloenxerto de ilhotas pancreáticas humanas, nestes animais, ao estimular o aumento da infiltração de linfócitos T reguladores (Tregs) nas cercanias das ilhotas enxertadas. As células

Treg teriam atividade regulatória, contrabalanceando a atividade pró-inflamatória dos linfócitos T efetores [78]. Corroborando esses achados, de acordo com Bayer et al, a IL-2 desempenharia um papel crucial na produção e expansão de células Treg no timo, durante o desenvolvimento do sistema imunológico, participando também, na fase adulta, da manutenção da homeostase dessas células [79]. Tais achados podem sustentar a suposição de que, o aumento da expressão gênica de IL-2 nos animais tratados com CTmTA no presente estudo, possa estar relacionado com a redução da inflamação, decorrente de intensa atividade regulatória exercida pelos linfócitos Tregs no parênquima renal destes animais, embora estudos imunohistoquímicos para a detecção de células Treg no parênquima renal ainda precisem ser realizados.

No presente estudo, a expressão gênica da IL-4 já se apresentava aumentada aos 15 dias de ablação renal entre os animais Nx quando comparados ao grupo Sham, e assim se manteve até o término do estudo. Classicamente, o aumento da expressão de IL-4 relaciona-se à fisiopatologia das doenças renais, em especial à esclerose glomerular. A produção renal exacerbada de IL-4 estimula o aumento da síntese de TGF- β , e conseqüente, o acúmulo anormal de MEC no parênquima renal [80].

A IL-4 desempenha inúmeros papéis biológicos no sistema imunológico, dentre os quais, a ativação de linfócitos B, sua diferenciação em plasmócitos, e o estímulo à proliferação de linfócitos T auxiliares e à diferenciação destes de um perfil Th0 para Th2, sabidamente menos pró-inflamatório em relação ao fenótipo Th1. Uma vez ativadas pela IL-4, as células Th0 diferenciam-se em Th2 e passam a produzir mais IL-4, em um ciclo de feedback positivo. Gadani e colaboradores demonstraram também que a IL-4 desempenha ainda, um papel crítico nas funções cerebrais superiores, exercendo um papel anti-inflamatório essencial que parece contribuir para a regulação da imunidade cerebral, com efeitos mensuráveis no processo de aprendizagem e com implicações favoráveis no que se refere a determinados distúrbios neurológicos [81].

Curiosamente, os resultados do presente trabalho mostraram maior expressão de IL-4 nos animais Nx tratados com CTmTA, com relação aos animais mantidos sem tratamento, o que poderia sugerir, de acordo com as teorias propostas pelos autores citados, maior presença de linfócitos T do fenótipo Th2 em relação ao Th1 no

parênquima renal dos animais tratados com CTmTA. Além disso, estudos recentes do grupo de Zang em um modelo experimental de injúria renal aguda mostraram que camundongos *knockout* para o gene da IL-4 apresentaram diminuição na população de macrófagos renais de fenótipo M2, ou seja, com características reparadoras do tecido e, um concomitante aumento do subtipo pró-inflamatório M1, acarretando lesão renal mais grave. Ainda de acordo com os autores, portanto, a citocina IL-4 desempenharia um importante papel na polarização dos macrófagos para o perfil M2, processo crucial na recuperação da injúria renal, o que faria com que o papel unicamente pró-inflamatório dessa citocina pudesse ser discutido [82].

Com relação à expressão gênica local de IL-6, observamos no presente estudo, que este gene já se apresentava superexpresso após 15 dias de indução da DRC, e assim se manteve até os 30 dias de ablação renal, corroborando a vasta literatura que relaciona esta interleucina à piora do quadro inflamatório em uma série de doenças crônicas. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que participa das respostas imunes inata e adaptativa e é sintetizada por diversos tipos celulares, como células endoteliais, fibroblastos e monócitos, sendo fundamental no processo inflamatório, [83]. Por contribuir para a diferenciação e recrutamento de leucócitos e estimular a produção de proteínas de fase aguda e crônica da inflamação [84]. Diversos estudos demonstraram que IL-6 está intimamente relacionada ao aumento da aterosclerose e, conseqüente da mortalidade por acometimento cardiovascular na DRC [85,86].

Em uma recentemente revisão bibliográfica, Feistauer e colaboradores constataram haver uma relação direta entre níveis elevados de IL-6 e a progressão da DRC [86]. Zhang et al observaram ainda, níveis elevados de IL-6 em biópsias renais de pacientes nefropatias, que se tornavam ainda mais evidentes entre os pacientes hipertensos, sinalizando uma possível correlação positiva entre elevadas concentrações de ANG II e a crescente produção de IL-6 nestes pacientes [87]. Além disso, a IL-6 seria capaz de estimular a proliferação de células renais mesangiais, contribuindo para o desenvolvimento das glomerulopatias [72,88].

Nossos resultados demonstraram que, enquanto nenhuma das monoterapias foi eficaz em conter o aumento da expressão gênica renal da IL-6, no grupo que recebeu a associação dos tratamentos (CTmTA+LOS), observamos uma redução

significativa da expressão deste gene, que assumiu valores semelhantes àqueles observados no grupo Sham, sinalizando para uma possível queda na atividade inflamatória no parênquima renal destes animais.

Por fim, conforme constatado neste estudo, os animais Nx apresentaram um pico de superexpressão gênica renal de IL-10, após 15 dias da indução da DRC, e a mesma se normalizou com o passar do tempo, independentemente do tratamento empregado. Uma vez que a IL-10 é caracterizada por seu efeito anti-inflamatório, possivelmente este aumento de expressão aos 15 dias tenha sido reflexo de mecanismos reguladores, que atuariam fisiologicamente em resposta a estresse e inflamação tecidual.

6. CONCLUSÕES

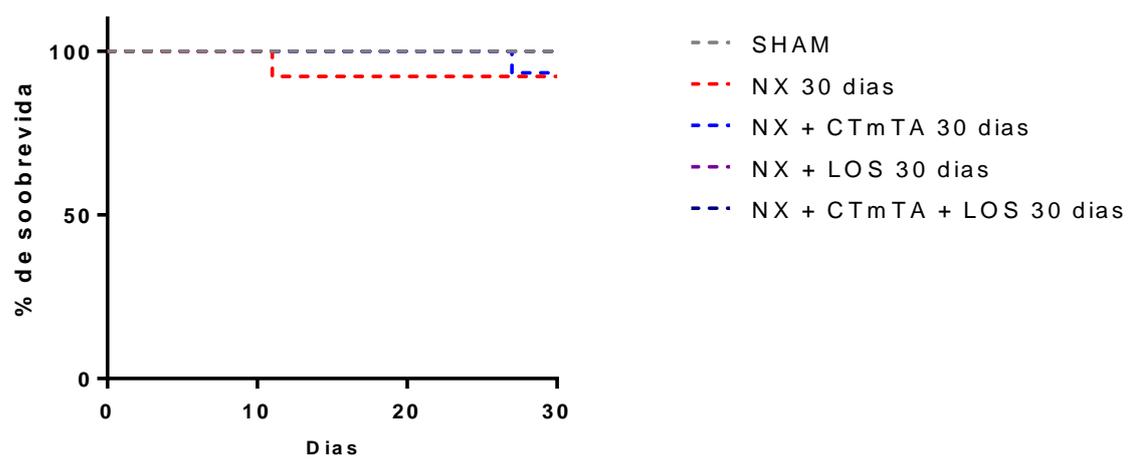
Analisados sob a luz da literatura atual, nossos resultados nos permitem concluir que a inoculação subcapsular de CTmTA exerceu um efeito renoprotetor nos animais submetidos ao modelo de ablação renal de 5/6, quando aplicadas após 15 dias da indução da DRC, quando a nefropatia já estava instalada nos animais e os mesmos encontravam-se significativamente hipertensos, albuminúricos e com disrupção importante da arquitetura tecidual renal. Os efeitos benéficos das CTmTA devem-se, muito possivelmente, ao papel imunomodulador e anti-inflamatório de fatores secretados por estas células localmente, que deflagrariam mecanismos de sinalização intercelular, modulando a resposta imunológica local.

Concluimos também que o efeito renoprotetor das CTmTA foi otimizado quando a aplicação das mesmas ocorreu em associação à administração de Losartan, um dos fármacos usualmente prescritos para o tratamento conservador da DRC. Nossos achados sugerem portanto, que além de não impactar os efeitos renoprotetores obtidos com o tratamento tradicional com Losartan, a inoculação de CTmTA pode trazer benefícios adicionais, se utilizada como terapia aditiva ao tratamento conservador atualmente empregado.

Por fim, com base em nossos achados, acreditamos que a associação terapêutica proposta neste estudo possa vir a contribuir com a prática clínica atualmente empregada no tratametndo da DRC, embora estudos adicionais acerca da segurança da aplicação local de CTmTA ainda precisem ser realizados.

7. APÊNDICE

% de sobrevivência



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, et al. **The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major non communicable diseases**. *Kidney Int.* 80(12):1258-70, 2011.
2. Saran R, Robinson B, Abbot KC, et al. US Renal Data System 2016 Annual Data Report: **Epidemiology of Kidney Disease in the United States**. *Am J Kidney Dis.* 69(3,1): A7-A8, 2017.
3. Sociedade Brasileira de Nefrologia. **Censo brasileiro de diálise: 2019**. Disponível em <https://bjnephrology.org/article/censo-brasileiro-de-dialise-analise-de-dados-da-decada-2016-2019>.
4. Anderson S. **Mechanisms of injury in progressive renal disease**. *Exp Nephrol* (1):34-40, 1996.
5. Zatz R in **Fisiopatologia Renal**. Ed. Silva, MR, ed Atheneu, 2ª edição, 2002.
6. Ruster C, Wolf G. **Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Progression of Renal Disease**. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17:2985–2991.
7. Zatz R, Fujihara CK. **Mechanisms of progressive renal disease: role of angiotensin II, cyclooxygenase products and nitric oxide**. *J Hypertens Suppl.* 2002 Jun;20(3): S37-44.
8. Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. **The inflammatory component in progressive renal disease – are interventions possible?** *Nephrol Dial Transplant* 17:363-368; 2002.
9. Fogo AB, et al. **Renal Fibrosis: not Just PAI-1 in the Sky**. *J Clin Invest* 112:326-328, 2003.
10. Rodríguez-Iturbe B, García García G. **The role of tubulointerstitial inflammation in the progression of chronic renal failure**. *Nephron Clin Pract.* 2010;116(2):c81-8. doi: 10.1159/000314656. Epub 2010 May 22. PMID: 20502043.
11. Teles F, da Silva TM, da Cruz Júnior FP, et al. **Brazilian red propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model**. *PLoS One.* Jan 21;10(1): e0116535, 2015.

12. Fanelli C, Arias SCA, Machado FG, et al. **Innate And Adaptive Immunity are Progressively Activated in Parallel with Renal Injury in the 5/6 Renal Ablation Model.** Sci Rep. Jun 9;7(1):3192, 2017.
13. KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes. **"KDIGO Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD)".** Kidney Int Suppl. 3 (1): 1–150, 2013.
14. Arias SCA, Valente CP, Machado FG, Fanelli C, Origassa CST, et al. **Regression of Albuminuria and Hypertension and Arrest of Severe Renal Injury by a Losartan-Hydrochlorothiazide Association in a Model of Very Advanced Nephropathy.** PLoS ONE 8(2): e56215. doi: 10.1371/journal.pone.0056215, 2013.
15. Cavaglieri RC, Martini D, Sogayar MC, Noronha IL. **Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model.** Transplant Proc. Apr;41(3):947-51, 2009.
16. Noronha IL, Cavaglieri RC, Janz FL, Duarte SA, Lopes MA, Zugaib M, Bydlowski SP. **The potential use of stem cells derived from human amniotic fluid in renal diseases.** Kidney Int Suppl Sep;1(3):77-82, 2011.
17. Schena FP, Abbatista MR. **Stem cells: reparative medicine and nephrology.** J. Nephrol. 16 Suppl 7: S1-5, 2003.
18. Minguell JJ, Lorino R, Lasala GP. **Myocardial implantation of a combination stem cell product by using a trans endocardial MYOSTAR injection catheter: A technical assessment.** Acute Card. Care. 13(1): 40-42, 2011.
19. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. **Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine.** Exp Mol Med. 15: 45-54, 2013.
20. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. **Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing.** PLoS One. 2008;3(4): e 1886. Published 2008 Apr 2. doi: 10.1371/journal.pone.0001886.
21. Zhang, Jian-Bo *et al.* **Adipose-derived mesenchymal stem cells therapy for acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion in a rat model.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, v. 44, n. 12, p. 1169-1286, 2017.

22. Santana AC, Dellê H, Cavaglieri RC, et al. **Protective effects of human amniotic fluid stem cells in a model of aorta allograft vasculopathy in rats.** *Transplant Proc.* Oct;44(8):2490-4, 2012.
23. Bassi EJ, Aita CAM, Camara NOS. **Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand?** *World J Stem Cells.* 3(1): 1–8, 2011.
24. Bassi EJ, Moraes-Vieira PM, Moreira Sá CS, et al. **Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes.** *Diabetes.* 61(10): 2534-2545, 2012.
25. Caplan AI, Dennis JE. **Mesenchymal stem cells as trophic mediators.** *J. Cell Biochem.* 98(5): 1076-1084, 2006.
26. Dorronsoro A, Robbins PD. **Regenerating the injured kidney with human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes.** *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(2):39. Published 2013 Apr 25. doi:10.1186/scrt187.
27. Aggarwal S, Pittenger MF. **Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses.** *Blood.* 2005;105(4):1815-1822. doi:10.1182/blood-2004-04-1559.
28. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. **Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide.** *Blood.* 2003;101(9):3722-9.
29. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, et al. **The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes.** *Haematologica.* 2008;93(9):1301-9.
30. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. **Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells.** *Blood.* 2005;105(10):4120-6
31. Caplan AI, **Mesenchymal stem cells.** *J. Orthop. Res.* 9(5): 641-650, 1991.
32. Young HE, Black AC JR. **Adult stem cells.** *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 276(1): 75-102, 2004.
33. Bydlowski SP, Debes A, Maselli LMF, Janz FL. **Biological characteristics of mesenchymal stem cells.** *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 31(S1): 25-35, 2009.

34. Ceccarelli S, Pontecorvi P, Anastasiadou E, Napoli C and Marchese C (2020) **Immunomodulatory Effect of Adipose-Derived Stem Cells: The Cutting Edge of Clinical Application.** *Front. Cell Dev. Biol.* 8:236. doi: 10.3389/fcell.2020.00236.
35. Dominici M, LE Blanc K, Mueller I, et al. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.** The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8(4): 315-317, 2006.
36. Caplan AI. **All MSCs are pericytes?** *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):229-230. doi: 10.1016/j.stem.2008.08.008.
37. Yarak S, Okamoto OK. **Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas.** *An. Bras. Dermatol.* vol.85 no.5 Rio de Janeiro Sept./Oct, 2010.
38. Zuttion MSSR, Wenceslau CV, Lemos PA, et al. **Células-tronco de tecido adiposo e a importância da padronização de um modelo animal para experimentação pré-clínica.** *Rev. Bras. Cardiol. Invasiva* 3 São Paulo, 2013.
39. Bertozzi N, Simonacci F, Grieco MP, et al. **The biological and clinical basis for the use of adipose-derived stem cells in the field of wound healing.** *Ann Med Surg (Lond).* Jun 23; 20:41-48, 2017.
40. Toyserkani NM, Jørgensen MG, Tabatabaeifar S, et al. **Concise Review: A Safety Assessment of Adipose-Derived Cell Therapy in Clinical Trials: A Systematic Review of Reported Adverse Events.** *Stem Cells Transl Med.* Sep;6(9):1786-1794, 2017.
41. Villanueva S, González F, Lorca E, et al. **Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for treating chronic kidney disease: A pilot study assessing safety and clinical feasibility.** *Kidney Res Clin Pract.* 2019;38(2):176-185. doi: 10.23876/j.krcp.18.0139.
42. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Müller-Newen G, and Floege J. **Transplanted Mesenchymal Stem Cells Accelerate Glomerular Healing in Experimental Glomerulonephritis.** *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 17:2202-12.
43. Cavaglieri, R.C. **Terapia com células-tronco na nefropatia crônica experimental: é possível bloquear a progressão da doença renal?** 2009. dissertação (mestrado em fisiopatologia experimental) - Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. doi:10.11606/d.5.2010.tde-19032010-125745.

44. Charan J, Kantharia ND. **How to calculate sample size in animal studies?** *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. October-December Vol 4, 4, 2013.
45. Morigi M, Imberti B, Zoja C. **Mesenchymal Stem Cells Are Renotropic, Helping to Repair the Kidney and Improve Function in Acute Renal Failure.** *J Am Soc Nephrol* 15: 1794–1804, 2004.
46. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF: **Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion.** *Immunochemistry* 2:235-254, 1965.
47. Jepsen FL, Mortensen PB. **Interstitial fibrosis of the renal cortex in minimal change lesion and its correlation with renal function: a quantitative study.** *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 383:265-70, 1979.
48. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL: **Some statistical methods useful in circulations research.** *Circ Res* 47:1-9, 1980.
49. Gupta N, Su X, Popov B, et al. **Intrapulmonary delivery of bone marrow derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin- induced acute lung injury in mice.** *J Immunol* 2007; 179:1855–1863.
50. Guyton, A. C. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças.** 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
51. Guarnieri G, Antonione R, Biolo G. **Mechanisms of Malnutrition in uremia.** *J Renal Nutr* 2003; 13:153-7.
52. Cardozo, M. T.; Vieira, I. O.; Campanella, L. C. A. **Alterações nutricionais em pacientes renais crônicos em programa de hemodiálise.** *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, 21(4):284-9, 2006.
53. Santos, N. S. J., et. al. **Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise.** *Rev. Nutr.*, Campinas, 17(3):339-349, jul./set., 2004.
54. Kirsztajn, G. M. **Assessment of glomerular filtration rate.** *Bras Patol Med Lab*, v. 43, n. 4, p. 257-264, 2007.
55. Sodr e, F. L., Costa, J. C. B., LIMA, J. C. C. **Avalia o da fun o e da les o renal: um desafio laboratorial.** *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, 2007.
56. Dalton, R. **Serum creatinine and glomerular filtration rate: perception and reality.** *J Bras Patol Med Lab*, v. 47, n. 1, 2011.

57. Morrison AB, Howard RM. **The functional capacity of hypertrophied nephrons. Effect of partial nephrectomy on the clearance of inulin and PAH in the rat.** *J Exp Med.* 1966;123(5):829-844. doi:10.1084/jem.123.5.829.
58. Fanelli C, Noreddin A, Nunes A.: **Inflammation in nonimmune-mediated chronic kidney disease.** In: **Chronic Kidney Disease - From Pathology to Clinical Improvements**, edited by Rath T, London, IntechOpen, 2018, pp 153–177.
59. Teles F, Machado F.G., Ventura B.H., Malheiros D.M., Fujihara C.K., Silva L.F., Zatz R. **Regression of glomerular injury by Losartan in experimental diabetic nephropathy.** *Kidney int.* 2008.Oct 22.
60. Melief, S. M., Zwaginga, J. J., Fibbe, W. E., and Roelofs, H. (2013). **Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts.** *Stem Cells Transl. Med.* 2,455–63. doi:10.5966/sctm.2012-0184.
61. Titan SM, M Vieira J Jr, Dominguez WV, Barros RT, Zatz R. **ACEI and ARB combination therapy in patients with macroalbuminuric diabetic nephropathy and low socioeconomic level: a double-blind randomized clinical trial.** *Clin Nephrol.* 2011 Oct;76(4):273-83. doi: 10.5414/cn107013. PMID: 21955862.
62. Wang, X., Chen, X., Huang, W. *et al.* **Losartan suppresses the inflammatory response in collagen-induced arthritis by inhibiting the MAPK and NF- κ B pathways in B and T cells.** *Inflammopharmacol* **27**, 487–502 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10787-018-0545-2>.
63. Haddad R, Saldanha-Araujo F. **Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far?** *Biomed Res Int.* 2014; 2014:216806. doi: 10.1155/2014/216806. Epub 2014 Jun 16. PMID: 25025040; PMCID: PMC4082893.
64. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. **Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells.** *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2821-7. doi: 10.1182/blood-2004-09-3696. Epub 2004 Dec 9. PMID: 15591115.
65. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. **Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli.** *Blood.* 2002 May 15;99(10):3838-43. doi: 10.1182/blood.v99.10.3838. PMID: 11986244.

66. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. **Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells.** J Biomed Sci. 2003 Mar-Apr;10(2):228-41. doi: 10.1007/BF02256058. PMID: 12595759..
67. Suva D, Passweg J, Arnaudeau S, Hoffmeyer P, Kindler V. **In vitro activated human T lymphocytes very efficiently attach to allogenic multipotent mesenchymal stromal cells and transmigrate under them.** J Cell Physiol. 2008 Mar;214(3):588-94. doi: 10.1002/jcp.21244. PMID: 17786951.
68. Quaedackers ME, Baan CC, Weimar W, Hoogduijn MJ. **Cell contact interaction between adipose-derived stromal cells and allo-activated T lymphocytes.** Eur J Immunol. 2009 Dec;39(12):3436-46. doi: 10.1002/eji.200939584. PMID: 19798683.
69. Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. **Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype.** Haematologica. 2005 Apr;90(4):516-25. PMID: 15820948.
70. Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, Sportoletti P, Falzetti F, Tabilio A. **Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells.** Exp Hematol. 2008 Mar;36(3):309-18. doi: 10.1016/j.exphem.2007.11.007. PMID: 18279718.
71. Taal MW, Zandi-Nejad K, Weening B, Shahsafaei A, Kato S, Lee KW, Ziai F, Jiang T, Brenner BM, MacKenzie HS. **Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney.** Kidney Int. 2000 Oct;58(4):1664-76. doi: 10.1111/j.1523-1755.2000.00327.x. PMID: 11012900.
72. Vianna HR, Soares CMBM, Tavares MS, Teixeira MM, Silva ACS. **Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines.** Braz. J. Nephrol. 2011;33(3):351-64.
73. Arend WP. **The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease.** Cytokine Growth Factor. Rev 2002; 13:323-40.
74. Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Vannice JL, Atkins RC. **Interleukin-1 receptor antagonist halts the progression of established crescentic glomerulonephritis in the rat.** Kidney Int 1995; 47:1303-9.

75. Tang WW, Feng L, Vannice JL, Wilson CB. **Interleukin-1 receptor antagonist ameliorates experimental antiglomerular basement membrane antibody-associated glomerulonephritis.** *J Clin Invest* 1994; 93:273-9.
76. Malek TR. **The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells.** *J Leukoc Biol.* 2003 Dec;74(6):961-5. doi: 10.1189/jlb.0603272. Epub 2003 Sep 2. PMID: 12960253.
77. Lenardo MJ. **Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis.** *Nature.* 1991;353(6347):858-861. doi:10.1038/353858a0.
78. Hu, M.; Hawthorne, W.J.; Nicholson, L. et al. **Low-Dose Interleukin-2 Combined With Rapamycin Led to an Expansion of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells and Prolonged Human Islet Allograft Survival in Humanized Mice.** 2020. *Diabetes* 2020 Aug; 69(8): 1735-1748. <https://doi.org/10.2337/db19-0525>.
79. Bayer AL, Yu A, Malek TR. **Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells.** *J Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4062-71. doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4062. PMID: 17371960.
80. Ruger BM, Hasan Q, Erb KJ, Davis PF. **Progression of renal disease in interleukin-4 transgenic mice: involvement of transforming growth factor-beta.** *Int J Exp Pathol.* 1999 Jun;80(3):113-23. doi: 10.1046/j.1365-2613.1999.00105.x. PMID: 10469267; PMCID: PMC2517769.
81. Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J. **IL-4 in the brain: a cytokine to remember.** *J Immunol.* 2012 Nov 1;189(9):4213-9. doi: 10.4049/jimmunol.1202246. PMID: 23087426; PMCID: PMC3481177.
82. Ming-Zhi Zhang, Xin Wang, Yinqiu Wang, Aolei Niu, Suwan Wang, Chenhang Zou, Raymond C. Harris, **IL-4/IL-13-mediated polarization of renal macrophages/dendritic cells to an M2a phenotype is essential for recovery from acute kidney injury.** *Kidney International*, Volume 91, Issue 2, 2017, Pages 375-386, ISSN 0085-2538. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.08.020>.
83. Gomes MAM, Neto NCM, Bispo IGA. **Interleucina-6, Molculas de Adeso Intercelular-1 e Microalbuminria na Avaliao da Leso Endotelial: Reviso de Literatura.** *Rev SOCERJ.* 2009;22(6):398-403.
84. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. **IL-10, IL-6, and TNF-: Central factors in the altered cytokine network of uremia the good, the bad, and the ugly.** *Kidney Int.* 2005;67(4):1216-33.

85. Tirelli AS, Colombo C, Torresani E, Fortunato F, Biffi A, Cariani L, et al. **Effects of treatment in the levels of circulating cytokines and growth factors in cystic fibrosis and dialyzed patients by multi-analytical determination with a biochip array platform.** *Cytokine*. 2013;62(3):413-20
86. Feistauer, M. D. A. V., Lazaretti, A. S., Poeta, J., & Roncada, C. (2017). **Associacao entre interleucina-6 e doenca renal cronica: uma revisao sistematica/Association between interleukin-6 and chronic renal disease: a systematic review.** *Revista de Ciências Médicas*, 26(3), 107-117.
87. Zhang W, Wang W, Yu H, Zhang Y, Dai Y, Ning C, et al. **Interleukin 6 Underlies Angiotensin II–Induced Hypertension and Chronic Renal Damage.** *Hypertension*. 2012;59(1):136-44.
88. Horii Y, Iwano M, Hirata E, Shiiki M, Fujii Y, Dohi K, et al. **Role of interleukin-6 in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis.** *Kidney Int Suppl* 1993;39(Suppl):S71-5.