

FELIPE LIMA DE SOUZA

**Avaliação do potencial terapêutico das células c-kit⁺in⁻ derivadas do tecido renal
de ratos no tratamento da doença renal crônica experimental**

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Prof.^a Dra. Samirah Abreu Gomes

SÃO PAULO

2022

FELIPE LIMA DE SOUZA

**Avaliação do potencial terapêutico das células c-kit⁺lin⁻ derivadas do tecido renal
de ratos no tratamento da doença renal crônica experimental**

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Prof.^a Dra. Samirah Abreu Gomes

SÃO PAULO

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Felipe Lima de

Avaliação do potencial terapêutico das células c-kit⁺ derivadas do tecido renal de ratos no tratamento da doença renal crônica experimental / Felipe Lima de Souza. -- São Paulo, 2022.

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

Orientadora: Samirah Abreu Gomes .

Descritores: 1.Terapia celular 2.Células-tronco mesenquimais 3.Fator de células-tronco 4.Insuficiência renal crônica 5.Nefrectomia

USP/FM/DBD-501/2022

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de nefrologia celular, genética e molecular- Laboratório de investigação médica (LIM) 29 com colaboração do laboratório de pesquisa básica em doenças renais - LIM 12, da faculdade de medicina da universidade de São Paulo (FMUSP) e instituto de ensino e pesquisa Albert Einstein - Hospital Israelita Albert Einstein - IIEP-HIAE e recebeu apoio financeiro do conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) , auxílio n°403296/2016-1 e n° 88887.615959/2021-00 (bolsa de mestrado)

*Dedico este trabalho a minha mãe
Irene Maria de Lima e a tia Marlene
Maria de Lima. Sem a força e
dedicação destas duas mulheres eu
não seria o homem que sou hoje.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente a minha mãe, Irene M. Lima, a Tia Marlene M. Lima e a minha irmã, Shirlene L. Souza, por toda ajuda e apoio durante a minha jornada. Sem a ajuda e a base de vocês não seria possível continuar a me desenvolver e aprimorar como pessoa e como profissional. Obrigado por deixar o nosso porto sempre seguro e pronto a me receber.

Gostaria de agradecer imensamente ao meu grande amigo, Diego Castro, pela ajuda e companheirismo ao longo desta jornada, obrigado por toda colaboração.

À minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Samirah Abreu Gomes, pela oportunidade e pelo contínuo aprendizado, só posso agradecer imensamente pela confiança depositada em mim e permitir ingressar neste projeto tão fascinante. Obrigado por ser uma orientadora, médica, psicóloga e muitas vezes mãe (Ah! Mãe da ciência! Dona Irene não precisa ficar com ciúmes!).

Agradeço à ajuda e a parceria do grupo da Prof^ª. Erika Rangel por toda a sua importante contribuição neste trabalho. Muito obrigado por tudo.

À minha amiga, Andreza Ap. Barbosa, uma pessoa extremamente amorosa e atenciosa, sem a sua ajuda e apoio não teria sido possível realizar este sonho, obrigado por ser a base deste projeto. Não posso deixar de agradecer também à Sabrina (filha da Andreza), a quem eu devo dar os créditos pelas fotos dos procedimentos cirúrgicos. Obrigado pela dedicação e a disponibilidade sempre.

Agradeço ao meu braço direito neste projeto, Lucas Sales. Muito obrigado por toda a sua dedicação e esforço e apoio nesta jornada, torço muito por você.

Agradeço imensamente à Mirela Santinho por ser uma amiga e companheira sempre com o seu humor contagiante. Obrigado por fazer os dias no laboratório mais suave, saborosos e com muitas festas.

Gostaria de agradecer a Prof^a Dr^a Irene Noronha pelo acolhimento no LIM 29 e o aprendizado contínuo em nossas reuniões de grupo, trazendo brilhantismo, sagacidade e inovação intelectual a todos nós. É uma honra fazer parte deste grupo.

A todos os amigos do LIM29, em especialmente a Margoth, Marcinha, Mirtes, Anderson, Camilla, Felipe O., Geovana, Paloma, Noah e Danieli por sempre se disporem a me auxiliarem nas mínimas coisas que fizeram grandes diferenças.

Não posso deixar de lembrar dos antigos colegas e amigos do LIM29, Rafael, Felipe, Priscila, Thalita, Mariana e Ritinha, que me acolheram no laboratório e me ensinaram a sagacidade e as influências técnicas nos diferentes setores. Obrigado por todo aprendizado e paciência.

Agradeço o apoio e ajuda do grupo de pesquisa do Prof.^o Dr. Luiz Fernando Onuchic, em especial ao Leandro, Eliane, Gilson e Lívia.

Gostaria de agradecer imensamente a Prof.^a Claudia Helou. Não tenho palavras para agradecer por todo o carinho, aprendizagem, acolhimento e confiança.

Gostaria de agradecer à Prof.^a Lucia Andrade, por sua disponibilidade, carinho e conhecimento, obrigado por abrir as portas do seu grupo no LIM12. Gostaria de agradecer a Dr^a. Talita Sanches e a Dr^a. Leticia Urbano, pessoas especiais e muito queridas, que entraram neste projeto no último ano e já contribuíram com sagacidade, inteligência e expertise. Muito obrigado pela ajuda, cumplicidade e todo acolhimento.

Agradeço aos alunos Antônio, Igor, Lucas e aos alunos de iniciação científica por toda contribuição e ajuda neste período. Obrigado pelo apoio, respeito, confiança, carinho e amizade, e principalmente por compartilharem sempre comigo meus momentos de risadas e estresse. Adoro vocês!

Gostaria de agradecer ao Prof. Antônio Carlos Seguro e Prof. Antônio Magaldi pelas conversas e momentos de descontrações. Agradeço ao apoio de todos do LIM12, em especial ao Dr. Rildo Volpini e Dr^a. Maria Heloisa Shimizu pela ajuda e contribuição. Agradeço pela parceria e ajuda da Eloá, Nivaldo e Denise por todo auxílio durante esse período, muito obrigado a todos.

Gostaria de agradecer aos Professores Rosa Moyses, Roberto Zatz e Vanda Jorgetti pela ajuda e contribuição e conversas neste período. Muito obrigado por todo o auxílio. Gostaria de agradecer a toda ajuda e apoio, em especial a Cleonice, Claudia, Ivone, Luciene, Solange, Janice, Wagner e a todos do LIM 16.

Meus agradecimentos a professora Juliana Reis e Machado por sua ajuda e contribuição neste estudo.

Ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro como aluno de pós-graduação.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE FIGURAS
RESUMO
ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Células-Tronco Mesenquimais	2
1.2 Células C-kit ⁺ Lin ⁻	4
1.3 Estudos sobre células C-KIT em humanos	7
1.4 C-KIT em adultos	8
2. OBJETIVO GERAL	10
2.1 Objetivos específicos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Protocolos experimentais com animais.....	11
3.2 Animais	11
3.3 Modelo de nefrectomia ou ablação renal 5/6.....	11
3.4 Anestésico	12
3.5 Procedimento cirúrgico.....	12
3.5.1 Nefrectomia 5/6.....	12
3.5.2 Injeções subcapsular renal das células c-kit ⁺ Lin ⁻ e MSC derivadas de tecido adiposo	14
3.5.3 Pós-operatório	15
3.5.4. Eutanásia	15
3.6 Células c-kit ⁺ Lin ⁻ tecido-específica de ratos neonatos e células mesenquimais derivadas de tecido adiposo de rato	15
3.7 Grupo de estudo	17
3.8 Pressão arterial caudal – PAC.....	19
3.9 Gaiola metabólica	20
3.10 Bioquímica.....	20
3.10.1 Creatinina Sérica	20
3.10.2 Ureia Sérica	20
3.10.3 Clearance de Creatinina	20
3. 10.4 Carga excretada de eletrólitos	21

3.11	Uroanálise	21
3.11.1.	Proteinúria	21
3.11.2	Albuminúria	22
3.12.	Osmolalidade	22
3.13	Avaliação histológica.....	22
3.13.1	Coloração de Tricrômico de Masson	23
3.14	Imunohistoquímica	24
3.14.1	Recuperação de epítomos.....	24
3.14.2	Revelação	24
3.15	Imunofluorescência.....	25
4.15.1	Recuperação de epítomos.....	25
3.16.	Análise estatística	26
4.	RESULTADOS.....	27
4.1	Validação do modelo de Nx5% em ratos Wistar	27
4.2	Diferenciação celular	29
4.3	Caracterização do perfil de população das MSC por citometria de fluxo	30
4.4	Expansão das células c-kit ⁺ Lin ⁻	31
4.5	Viabilidade celular no momento da inoculação.....	31
4.7	Sobrevivência.....	32
4.8	Peso.....	33
4.9	Relação massa cardíaca a e peso corporal	34
4.10	Relação da massa renal e peso corporal.....	35
4.11	Pressão arterial caudal (PAC)	36
4.12	Proteinúria.....	38
4.13	Albuminúria	39
4.14	Bioquímica sérica	40
4.14.1	Ureia sérica.....	41
4.14. 2	Creatinina sérica.....	42
4.15	Clearance de Creatinina	43
4.16	Gaiola metabólica	44
4.16.1	Consumo de água (mL/24 horas)	44
4.16.2	Volume urinário	45
4.16.3	Osmolalidade Urinária	46
4.16.4	Carga excretada de sódio.....	47

4.16.5 Carga excretada de potássio	48
4.17 Antígeno de Proliferação celular (PCNA)	49
4.18 Expressão de leucócitos Totais no Tecido (CD43).....	50
4.19 Linfócitos (CD3).....	51
4.20 Macrófagos (CD206 e CD68).....	52
4.21 Achados da histopatológicos	54
4.21.1 Avaliação da glomeruloesclerose.....	55
5 DISCUSSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
°C	Celsius
μ	Micro
CD	<i>Cluster determinant</i>
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
cm	CEMTIMETRO
Cr	Creatinina
dL	Decilitro
DRC	Doença Renal Crônica
g	Gramas
GM	Gaiola Metabólica
H ₂ O	água
hrs	Horas
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IP	Peritoneal
Kg	quilograma
L	Litro
LIM	Laboratório de Investigações médica
mEq	miliequivalente
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mOsm	miliosmol
MSC	Células-tronco mesenquimais
Nx%	Nefrectomia %
PAC	Pressão Arterial Caudal
TBS	Solução salina fosfato-tamponada
PCNA	Célula em proliferação
Ph	Potencial hidrogênio
RPM	Rotação por minuto

SC	Subcutâneo
TBS	solução salina fosfato-tamponada
vL	Volume
Vs	Versus
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -. Avaliação do perfil nos animais no 15° dia após a Nx⁵%..... 27

Tabela 2 - Achados séricos nos diferentes grupos..... 40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustrativa do receptor c-kit associada ao ligante SCF, desencadeando via de sinalização intracelular correspondendo ao gene de transcrição (azul), da proliferação, sobrevivência e adesão celular (verde), proliferação e diferenciação celular (laranja) e de desregulação do receptor (marrom). Fonte: adaptação de Feng et al.,2015. 5

Figura 2 - Estratégias para regeneração renal. As células c-kit⁺Lin⁻ são células-tronco específicas renais e estão presentes no período pós natal. (Adaptado de Biancone, L. & Camussi). Abreviações: NCAM: molécula de adesão neural; MSC: Célula-tronco mesenquimal; iPSCs – células-tronco pluripotente induzida; GPSC – célula germinativa derivada de célula-tronco pluripotentes..... 6

Figura 3 - Para a realização do procedimento cirúrgico os animais foram A) anestesiados com isoflurano; B) realização da tricotomia da região abdominal; C) realização da assepsia; D) posicionamento do campo cirúrgico; E) abertura da cavidade abdominal, F) sendo realizado o afastamento das vísceras abdominal, seguida pelo fechamento da ramificação posterior da arterial renal, G) evidenciado pela isquemia da região no momento da ligadura H) foi realizado a ligadura da ramificação anterior inferior, I) após esse procedimento o rim direito foi exposto e realizado a nefrectomia unilateral, conforme J) ilustração detalhada do procedimento de Nx⁵%. K) realizado o fechamento da camada L) muscular M) pele, seguido por N) analgesia do animal. O) Os animais foram monitorados em gaiola com maravalha sobre a cama térmica a 37°C. (fotos de Sabine Senne). 13

Figura 4.- A) inoculação das células foi realizada após a anestesia dos animais com isoflurano. B) esse foi imobilizado na posição decúbito lateral direito, C) o rim do animal foi isolado e D) inoculado 10µL de solução contendo 1x10⁶ de células. E) Esquema representativo demonstrando a inoculação das células, após inoculação a cavidade lombar foi fechada a camada muscular e de pele, F) imagem representando o aspecto da lesão no momento da inoculação das células (fotos de Sabine Senne). 14

Figura 5 - Esquematização da distribuição dos animais..... 18

Figura 6 - Modelo de prontuário para registro individual dos animais do estudo.....	19
Figura 7 Análise da fibrose intersticial após 15 dias da Nx ^{5%} . É possível observar maior porcentagem de fibrose Intersticial no grupo Nx ^{5%} quando comparado ao grupo sham (aumento de 200x) (^a p<0,05).....	28
Figura 8- A) Imagem representativa das células com características fusiformes durante o cultivo celular (400X). Ensaio de Caracterização e diferenciação: B) adipogênica, com presença de vacúolos lipídicos após a coloração de oil-red; C) osteogênica após coloração em vermelh (alizarin red) e D) condrogênica, com presença de matriz extracelular detectada pela coloração de Alcian Blue.....	29
Figura 9 Caracterização de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo, de A, B e C) controle negativo, MSC foram positivas para D) CD105 E) CD90, F) CD44, e G) negativa para CD45.....	30
Figura 10 Aspecto das células c-kit+Lin- no momento do descongelamento (aumento de 10X), em campo escuro; B) detecção da GFP nas células c-kit+Lin	31
Figura 11 - Curva de sobrevivência nos diferentes grupos	32
Figura 12 - Média de peso dos diferentes grupos ao longo de 30 dias.....	33
Figura 13 - Relação da massa cardíaca e peso corporal dos diferentes grupos chamando atenção para a melhora da relação da massa cardíaca e o peso corporal em ambos os tratamentos, porém, de forma mais acentuada no grupo que recebeu células C-KIT. ...	34
Figura 14 - Relação da Massa renal e peso corporal	35

Figura 15 -Curva da PAC dos diferentes grupos, evidenciando aumento da pressão arterial sistólica no 15º dia, em todos os grupos submetidos ao procedimento de Nx5% Apenas o tratamento com MSC reduziu a pressão arterial dos animais com DRC.....	36
Figura 16 Avaliação do delta de queda da pressão arterial no 30º dia.	37
Figura 17 - Curva de proteinúria de 24h nos diferentes grupos nos dias 0, 15 e 30.....	38
Figura 18 - Curva de excreção de albuminúria de 24h nos diferentes grupos no dia 0, 15 e 30.	39
Figura 19 - A avaliação da ureia sérica após 30 dias evidenciou que todos os animais submetidos a procedimento de Nx5% (^a p<0,05), apresentaram aumento desse biomarcador, quando comparado aos animais do grupo sham. E ambos os tratamentos não alteraram este parâmetro.....	41
Figura 20 - A avaliação da creatinina sérica após 30 dias evidenciou que todos os animais submetidos a Nx5% (^a p<0,05) apresentaram aumento desse biomarcador, quando comparado com os animais do grupo sham. E ambos os tratamentos não reduziram esse parâmetro.....	42
Figura 21 - Avaliação do clearance de creatinina dos diferentes grupos no 30º dia.	43
Figura 22 - Curva de consumo de água em 24 horas nos diferentes grupos nos dias 0, 15 e 30 dias de estudo.....	44
Figura 23 - Curva do volume urinário em 24 horas nos diferentes grupos nos dias 0, 15 e 30 dias de estudo.	45
Figura 24 - Curva de osmolalidade urinária em todos os animais submetidos a Nx5% nos dias 0, 15 e 30.....	46

Figura 25 - Carga excretada de sódio no 30º dia nos diferentes grupos.....	47
Figura 26 - Carga excretada de potássio no 30º dia nos diferentes grupos.	48
Figura 27 -Determinação (em aumento de 200x) e quantificação da proliferação celular através da detecção do anti-PCNA por imunohistoquímica (em marrom) no córtex renal dos diferentes grupos no 30º dia (200X).	49
Figura 28 - Determinação e quantificação de leucócitos totais através do marcador anti-CD43 por imunohistoquímica (em marrom) no córtex renal dos diferentes grupos no 30º dia (aumento de 200X).	50
Figura 29 - Determinação e quantificação linfócitos totais através do marcador anti-CD3 por imunohistoquímica (em marrom) (aumento de 200x) no córtex renal dos diferentes grupos no 30º dia.	51
Figura 30 -Imagens representativas da expressão de macrófagos por imunofluorescência nos diferentes grupos, em aumento de 400x. A) Marcação em azul (núcleos pelo DAPI); B) marcação em verde (receptor CD68); C) marcação em vermelho (receptor CD206) e D) merge — indica marcação para M2.	52
Figura31- Expressão de Macrófagos nos diferentes grupos. A) número total de macrófagos M1(CD68 ⁺ CD206 ⁻) (em vermelho) (p<0,05 versus- ^a sham, ^b Nx5%, ^c Nx+MSC) e M2 (CD68 ⁺ CD206 ⁺) (azul) (p<0,05 versus ^A sham, ^B Nx5%, ^C Nx+MSC) B) relação de macrófagos M2/M1; C) Avaliação da subpopulação de M1 (CD68 ⁺ CD206 ⁻); e D) M2 (CD68 ⁺ CD206 ⁺).....	53
Figura 32 - Quantificação de glomérulos totais em cortes de parafina (3mm ²) por HE.	54
Figura 33 - Porcentagem de glomeruloesclerose global totais em cortes de parafina (3mm ²) por HE nos diferentes grupos.	55

Figura 34 - Porcentagem de glomerulosclerose segmentar totais em cortes de parafina (3mm²) por HE nos diferentes grupos 56

Figura 35 - Determinação e quantificação de fibrose intersticial por meio da coloração de tricrômio de Masson (azul) no córtex renal dos diferentes grupos no 30º dia (aumento de 400x)..... 57

RESUMO

Souza FL. Avaliação do potencial terapêutico das células c-kit⁺lin⁻ derivadas do tecido renal de ratos no tratamento da doença renal crônica experimental [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Diversos estudos em modelos experimentais de doença renal crônica (DRC) evidenciaram efeito renoprotetor usando células-tronco mesenquimais (MSC) extraídas de tecidos extra renais. Por outro lado, nós demonstramos pela primeira vez na literatura, que células c-kit⁺Lin⁻ isoladas de rim de ratos em desenvolvimento (neonatos) exibem propriedades de células-tronco e capacidade regenerativa, verificadas após uma lesão renal aguda do tipo isquemia e reperfusão. Adicionalmente, nosso estudo recente em modelo de glomerulonefrite aguda induzido por puromicina também evidenciou que as células c-kit⁺Lin⁻ contribuem para o reparo do citoesqueleto podocitário. Embora nossos estudos tenham mostrado a melhora em modelos de doença aguda e em glomerulopatia seu potencial regenerativo ainda não foi testado para doença renal crônica. Sendo assim, o objetivo principal do presente estudo é testar de forma pioneira a capacidade regenerativa das células c-kit⁺Lin⁻ isoladas de rim de ratos neonatos e compará-las com as células tronco mesenquimais para o tratamento da doença renal crônica no modelo experimental de nefrectomia 5/6. Após aprovação no CEUA (nº 945/17), foram usados 40 ratos Wistar machos (6 a 8 semanas de idade, peso 240-280g) e randomizados em quatro grupos com n=10 em cada: (1) sham, (2) Nx^{5%}, (3) Nx+MSC, (4) Nx+C-KIT. Os grupos tratados receberam 1×10⁶ células por via subcapsular 15 dias após a nefrectomia (fase de doença já estabelecida). Todos os animais foram submetidos à medição de pressão arterial caudal (PAC) e coleta de urina de 24 horas. No 15º dia após inoculação das células, todos os animais foram eutanasiados para coleta de sangue e realização de imunohistoquímica e imunofluorescência e análise histológica e morfológica. Nossos resultados demonstraram uma elevação das escórias nitrogenadas (média de creatinina = 0,73 vs 0,44 mg/dL e uréia=124 vs 59 mg/dL), da PAC (205 vs 143 mmHg), e da proteinúria (235 vs 18 mg/24hs) e albuminúria (5,4 vs 0,5 mg/24hs) mostrando que os animais desenvolveram DRC em todos os grupos submetidos à Nx^{5%} quando comparados ao sham. Notadamente, apenas o grupo Nx+MSC foi capaz de reduzir a PAC (-Δ32%). Entretanto, ambos os grupos tratados apresentaram melhora significativa da proteinúria

(~60%) e da albuminúria (~70%). Digno de nota, houve redução intensa de proliferação celular (PCNA) após uso das MSC sendo que o tratamento com as c-kit⁺Lin⁻ praticamente não levou a mudança no padrão de proliferação celular. Em relação a inflamação, observamos um aumento (~50%) de CD43 no grupo Nx^{5%}, e o tratamento com MSC bloqueou quase completamente a sua expressão. Já o grupo Ckit também reduziu a expressão de CD43, porém em menor proporção do que o grupo NX+MSC. Similarmente, a expressão de linfócitos T aumentou no grupo Nx^{5%}, e praticamente foi bloqueada com uso de MSC e inalterada com o uso das c-kit⁺Lin⁻. Na avaliação dos macrófagos nos diferentes grupos, foi observado que no grupo Nx^{5%} houve aumento global e significativo das populações de M1 e M2, e somente o tratamento com células MSC diminuíram a expressão dos macrófagos a níveis normais e semelhante ao grupo sham. Em contrapartida, o grupo Ckit apresentou um aumento bastante significativo de de 1,5x de marcação em relação aos os animais com DRC, tanto na expressão de M1 quanto M2. Especificamente, é importante ressaltar que a quantidade de marcação para M2 exibiu um aumento maior nos animais tratados com células c-kit⁺Lin⁻ revelando que estas células também agem de forma anti-inflamatória modulando a resposta inata. Chama a nossa atenção em relação ao evento de fibrose intersticial que após 30 dias da indução da DRC, ambos os tratamentos apresentaram similarmente menor grau de fibrose intersticial (~50%) pelo Tricrômico de Masson comparado ao grupo não tratado. Para finalizar, houve aumento da glomeruesclerose global e segmentar em todos os animais submetidos ao procedimento de Nx^{5%} e ambos os tratamentos não mostraram melhora deste parâmetro. Visto em conjunto, chegamos à conclusão que nossos resultados sugerem pela primeira vez que as células ckit⁺Lin⁻ tecido específica renal podem ser usadas como uma nova alternativa terapêutica para diminuição da progressão da DRC em modelo experimental. Futuros experimentos e estudos pré-clínicos usando as células ckit⁺Lin⁻ são necessários para explorar e entender melhor os mecanismos de ação destas células.

Palavras-chave: Terapia celular, Células-tronco mesenquimais, Fator de células-tronco, Insuficiência renal crônica, Nefrectomia.

ABSTRACT

Souza FL. Evaluation of the therapeutic potential of c-kit+lin-derived cells from the renal tissue of rats in the treatment of experimental chronic kidney disease [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Several studies in experimental models of chronic kidney disease (CKD) have shown a renoprotective effect using mesenchymal stem cells (MSC) isolated from extra-renal tissues. On the other hand, we demonstrated for the first time in the literature that c-kit+Lin- cells isolated from the kidney of developing rats (neonates) exhibit stem cell properties and regenerative capacity, verified after an acute kidney injury of the ischemia and reperfusion model. Additionally, our recent study in a model of acute glomerulonephritis induced by puromycin also showed that c-kit+Lin- cells contribute to the repair of the podocyte cytoskeleton. Although our studies have shown improvement in models of acute disease and in glomerulopathy, its regenerative potential has not yet been tested for chronic kidney disease. Therefore, the main objective of the present study is to test in a pioneering way the regenerative capacity of c-kit+Lin- cells isolated from the kidney of newborn rats and compare them with mesenchymal stem cells for the treatment of chronic kidney disease in the experimental model of nephrectomy 5/6. After CEUA approval (nº 945/17), 40 male Wistar rats (6 to 8 weeks old, weight 240-280g) were used and randomized into four groups with n=10 in each: (1) sham, (2) Nx^{5%}, (3) Nx+MSC, (4) Nx+C-KIT. Treated groups received 1×10⁶ cells subcapsularly 15 days after nephrectomy (established disease phase). All animals underwent measurement of caudal arterial pressure (CAP) and 24-hour urine collection. On the 15th day after cell inoculation, all animals were euthanized for blood collection and immunohistochemistry and immunofluorescence and histological and morphological analysis. Our results showed an increase in nitrogenous compounds (mean creatinine = 0.73 vs 0.44 mg/dL and urea = 124 vs 59 mg/dL), CAP (205 vs 143 mmHg), and proteinuria (235 vs 18 mg/24hs) and albuminuria (5.4 vs 0.5 mg/24hs) showing that the animals developed CKD in all groups submitted to Nx^{5%} when compared to sham. Notably, only the Nx + MSC group was able to reduce CAP (-Δ32%). However, both treated groups showed significant improvement in proteinuria (~60%) and albuminuria (~70%). Noteworthy, there was an

intense reduction in cell proliferation (PCNA) after the use of MSCs, and treatment with c-kit+Lin- practically did not change the pattern of cell proliferation. Regarding inflammation, we observed an increase (~50%) of CD43 in the Nx⁵% group, and MSC treatment almost completely blocked its expression. The C-KIT group also reduced CD43 expression, but to a lesser extent than the NX+ MSC group. Similarly, the expression of T lymphocytes increased in the Nx⁵% group, and was practically blocked with the use of MSC and unaltered with the use of c-kit+Lin-. Evaluation of macrophages in the different groups, it was observed that in the Nx⁵% group there was a global and significant increase in the populations of M1 and M2, and only the treatment with MSC cells reduced the expression of macrophages to normal levels and similar to the sham group. On the other hand, the Ckit group showed a very significant increase in staining a round 1.5x in comparison to the animals with CKD, both in the expression of M1 and M2. Specifically, it is important to emphasize that the amount of staining for M2 showed a greater increase in animals treated with c-kit+Lin- cells, revealing that these cells also act in an anti-inflammatory way, modulating the innate response. It draws our attention in relation to the interstitial fibrosis event that after 30 days of CKD induction, both treatments similarly presented a lower degree of interstitial fibrosis (~50%) by Masson's Trichrome compared to the untreated group. Finally, there was an increase in global and segmental glomeruesclerosis in all animals submitted to the Nx⁵% procedure and both treatments did not show improvement in this parameter. Taken together, we came to the conclusion that our results suggest for the first time that renal-tissue specific ckit+Lin- cells can be used as a new therapeutic approach to decrease the progression of CKD in an experimental model. Future experiments and preclinical studies using ckit+Lin- cells are needed to explore and better understand the mechanisms of action of these cells.

Keywords: Cell therapy. Mesenchymal stem cells. Stem cell factor. Renal insufficiency chronic. Nephrectomy.

1. INTRODUÇÃO

A Doença Renal Crônica (DRC) é uma doença caracterizada pela perda progressiva e irreversível da função renal (Webster et al., 2017), sendo uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo (Gouveia et al., 2017; Lipworth et al., 2012). Ainda existem inúmeras dificuldades e limitações no acesso ao tratamento desses pacientes e, infelizmente, as drogas mais recentes como as glifozinas que já demonstraram bons resultados para o tratamento da DRC ainda não estão disponíveis para todos os pacientes do Sistema Único de Saúde devido seu alto custo. Adicionalmente, o diagnóstico da DRC, em sua grande maioria, se faz já em estágio avançado da doença, muitas vezes com necessidade imediata de terapia renal substitutiva (Thomé et al., 2019; Webster et al., 2017).

No Brasil, de acordo com o censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia, estima-se que, em 2021, o total de pacientes em tratamento dialítico era de 148.363 (5%). A Terapia Renal Substitutiva pode ser realizada por meio da hemodiálise três vezes na semana por quatro horas, onde o paciente é submetido a um processo de filtração de toxinas urêmicas (Abbud Filho & Lopes, 2017) ou diálise peritoneal (modalidade que utiliza o peritônio para que ocorra a passagem das substâncias tóxicas para a solução de diálise) (Jain et al., 2012). Outra forma de tratamento da DRC é o transplante renal, entretanto, a disponibilidade de órgãos para a realização desse transplante é extremamente limitada e demorada, o que leva os pacientes com DRC a permanecerem por muito tempo em diálise, aumentando o risco de complicações clínicas, além de causar um impacto negativo relevante na qualidade de vida dos pacientes (Silva et al., 2016).

Nesse contexto, uma nova possibilidade terapêutica, como a terapia com células-tronco, além das novas drogas já existentes para tratamento da DRC, abre uma nova possibilidade terapêutica para estes pacientes, sobretudo naqueles que se apresentam em estágios mais precoces da doença, onde a janela de oportunidades é maior.

Dentre as estratégias inovadoras atuais que envolvem a regeneração renal com uso de terapia celular, as células mais frequentemente usadas são as de células-tronco mesenquimais de medula óssea ou tecido adiposo. Entretanto, nós demonstramos pela primeira vez na literatura, que células $c\text{-kit}^+\text{Lin}^-$ isoladas de rim de ratos em desenvolvimento (neonatos) exibem propriedades de células-tronco e capacidade regenerativa, verificadas após uma lesão renal aguda do tipo isquemia e reperfusão (Rangel et al., 2013), abrindo um espaço para testar estas células $c\text{-kit}^+\text{Lin}^-$ em outros modelos animais e verificar seus mecanismos de ação além de compará-las com as já conhecidas células mesenquimais (Gomes et al., 2018; Roemeling-van Rhijn et al., 2013).

1.1 Células-Tronco Mesenquimais

Classicamente, as células-tronco mesenquimais (MSC) possuem características específicas que possibilitam sua identificação e auxiliam no seu isolamento como, por exemplo, a aderência ao plástico, a especificidade na expressão de antígenos (CD105, CD73 e CD90) e o multipotencial de diferenciação celular para osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*. (Dominici et al., 2006) Às MSC são encontradas em diversos tecidos tais como: medula óssea, cordão umbilical, pericito, líquido amniótico, tecido adiposo, dentre outros. Embora a medula óssea seja a fonte mais comumente usada, o tecido adiposo vem se tornando uma fonte bastante atrativa devido à grande reserva

tecidual que existe no organismo, além de ser de fácil obtenção e apresentar uma capacidade proliferativa *in vitro* de quatro a cinco vezes maior que as de medula óssea. Adicionalmente, as MSC, independentemente da origem, secretam diversos fatores de crescimento e citocinas coadjuvantes na regeneração tecidual (Roemeling-van Rhijn et al., 2013) Existem pequenas diferenças moleculares entre as células-tronco derivadas de medula óssea e as derivadas do tecido adiposo e, acredita-se que dos genes expressos, cerca de menos de 1% se diferem. Já as similaridades entre elas consistem nas propriedades imunossupressoras, além da deficiência na expressão de HLA-DR o que traz a esta célula a capacidade de não ser rejeitada pelo hospedeiro. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos na capacidade imunomodulatória estariam a interação das MSC com diversas células do sistema imune como, por exemplo, a inibição da proliferação de células T e B. Essa interação ocorreria através do contato célula com célula e também por efeitos parácrinos como, por exemplo, a secreção de TGF- β e IL-10 (Engela et al., 2013).

Na literatura, existem diferentes estudos que usaram MSC de fonte extra renal (medula óssea, tecido adiposo ou líquido amniótico) em vários modelos de doença renal, tanto aguda quanto crônica, que já demonstraram efeitos imunossupressores, como a diminuição da fibrose intersticial e da glomerulosclerose, melhora da hipertensão, e melhora dos níveis de ureia e creatinina (Cavaglieri et al., 2009; Donizetti-Oliveira et al., 2011; Sagrinati et al., 2006).

Em relação ao uso destas células mesenquimais no tratamento da DRC, estudos prévios de pesquisadores brasileiros (Alexandre et al., 2009; Cavaglieri et al., 2009; Donizetti-Oliveira et al., 2011; Noronha et al., 2011) e outros grupos internacionais (Peng et al., 2013) demonstraram que células-tronco mesenquimais de diferentes tecidos e de algumas linhagens específica da medula óssea são capazes de melhorar a lesão renal crônica em modelos experimentais. Entretanto, até o presente momento, não existe

nenhum estudo clínico publicado demonstrando o potencial destas células no tratamento de pacientes com DRC.

1.2 Células C-kit⁺Lin⁻

As Células c-kit⁺Lin⁻ expressam o receptor c-kit ou CD117 e podem ser encontradas em diferentes órgãos de origem mesoderma, destacando a medula óssea, pâncreas, coração, pulmão, fígado, cérebro, e o tecido renal. No que se refere ao receptor c-kit, este faz parte da família dos receptores de tirosina quinase do tipo III, apresentando uma sequência de 976 aminoácidos e com massa molecular de 145 kDa. A família destes receptores apresenta 2 domínios, um extracelular e o outro intracelular. O domínio extracelular, em contato direto com a região externa da célula, trata-se de uma região altamente hidrofóbica, quando inativa apresenta forma de dímero. Conforme o receptor passa pela membrana celular (região transmembrana) apresenta formato de α -hélice. Ao passar para o citoplasma, o receptor apresenta uma cauda carboxi-terminal, sendo esta região onde ocorre o domínio da proteína quinase, por um sítio de resíduo de tirosina (Hubbard, 2004).

A ativação do receptor ocorre por intermédio de seu ligante, SCF (Fator de célula-tronco) (Lennartsson & Rönnstrand, 2012), na região extracelular, e este evento causa no domínio intracelular a fosforilação dos resíduos de tirosina. Após a fosforilação, os domínios da quinase tornam-se totalmente ativos e um subconjunto de fosfotirosina se torna disponível como sítios de recrutamento para proteínas que contêm domínios de ligação à fosfotirosina. Tudo isto culmina no desfecho da ativação das vias de proliferação, diferenciação, sobrevivência, adesão, mobilidade celular além da ativação de vias angiogênicas. (Figura 1) (Hubbard, 2004). Na sequência, o receptor CD117 sofre

internalização celular e é degradado pelo SOCS6 (supressor de sinalização de citocina 6) (Foster et al., 2018).

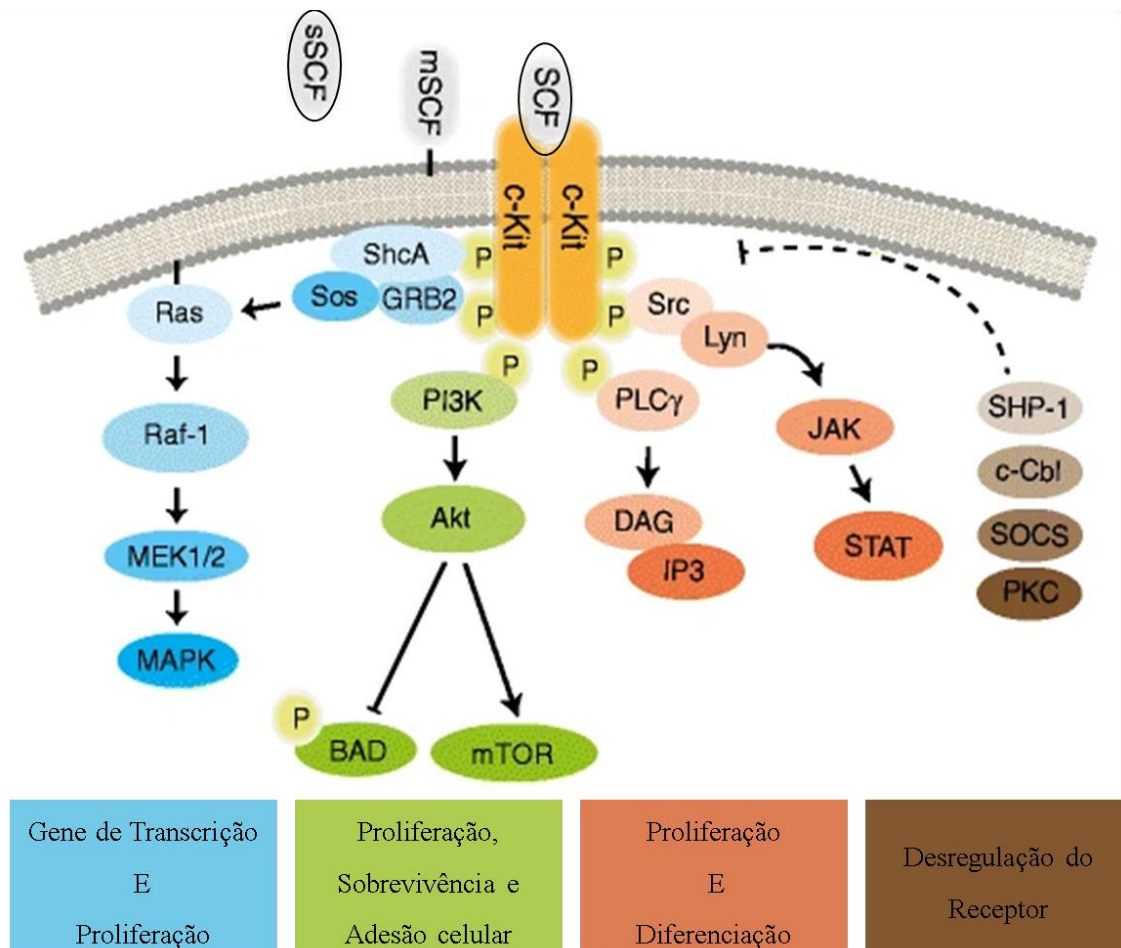


Figura 1 - Ilustrativa do receptor c-kit associada ao ligante SCF, desencadeando via de sinalização intracelular correspondendo ao gene de transcrição (azul), da proliferação, sobrevivência e adesão celular (verde), proliferação e diferenciação celular (laranja) e de desregulação do receptor (marrom). Fonte: adaptação de Feng et al., 2015.

Classicamente, a expressão do receptor tirosina kinase c-kit também é detectada em células diferenciadas como; mastócitos, células germinativas, melanócitos, células gástricas de Cajal, células fetais endoteliais e neurônios. Entretanto, as células c-kit⁺Lin⁻ positivas também foram descritas como células-tronco em diversos órgãos e tecidos tais como: medula óssea (Ogawa et al., 1993), líquido amniótico (de Coppi et al., 2007),

pulmões (Kajstura et al., 2011), coração (Beltrami et al., 2003) e fígado (Crosby et al., 2001). Nesta direção, estas células também foram identificadas durante o desenvolvimento do período embrionário do mesênquima metanéfrico sendo seu ligante o SCF (*stem cell factor*) bastante expresso no broto ureteral (Schmidt-Ott et al., 2005). Apesar destas células já terem sido descritas como presentes no rim no período embrionário, nosso grupo foi o primeiro na literatura que levantou e confirmou a hipótese de que as células $c\text{-kit}^+ \text{Lin}^-$ representam uma população de células-tronco renais, que estão presentes no período neonatal e permanecem na fase adulta e, portanto, são células tecido-específicas que contribuem para a homeostase tecidual e possuem potencial regenerativo no tratamento da insuficiência renal aguda em modelo de lesão de isquemia reperfusão (10). Adicionalmente, este nosso estudo publicado foi citado e descrito como sendo um dos estudos chave para novas estratégias na regeneração renal (Figura 2) (Biancone & Camussi, 2014).

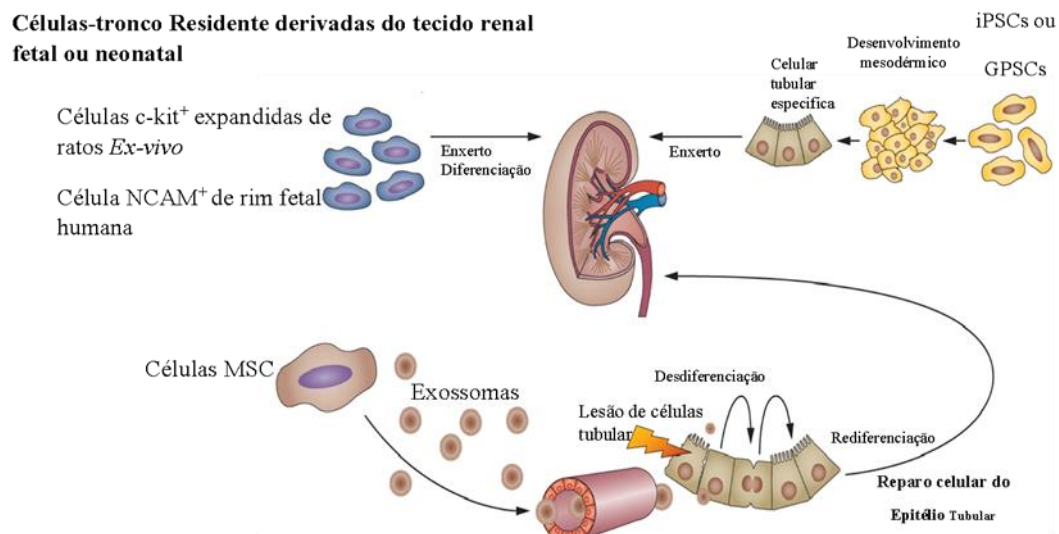


Figura 2 - Estratégias para regeneração renal. As células $c\text{-kit}^+ \text{Lin}^-$ são células-tronco específicas renais e estão presentes no período pós natal. (Adaptado de Biancone, L. & Camussi). Abreviações: NCAM: molécula de adesão neural; MSC: Célula-tronco mesenquimal; iPSCs – células-tronco pluripotente induzida; GPSC – célula germinativa derivada de célula-tronco pluripotentes.

A busca por células-tronco renais tem sido o foco de extensa pesquisa. A identificação de uma população de progenitores renais forneceria informações biológicas

importantes e poderia ser usado terapêuticamente para gerar novas células tubulares, glomerulares e vasculares para o tratamento de doenças renais. Descobertas do nosso grupo suportam que as células c-kit⁺Lin⁻ isoladas de rim de rato neonatal representam uma nova população de células progenitoras/tronco. Portanto, as células c-Kit⁺Lin⁻ cumprem todos os critérios de progenitor/célula-tronco, incluindo capacidade de autorrenovação, clonogenicidade e multipotencialidade (2013). Complementarmente as células c-Kit⁺Lin⁻ *in vitro* formaram nefrosferas quando semeadas em densidade clonal e foram positivas para marcadores epiteliais, endoteliais e neuronais.

Uma outra característica importante, é que as células c-Kit⁺Lin⁻ exibem o potencial terapêutico renal multicompartimental (tubular, vascular e glomerular) após modelo de lesão aguda de isquemia-reperfusão (Rangel et al., 2013). Já no modelo de proteinúria aguda induzida por puromicina, o tratamento com as células c-Kit⁺Lin⁻ resgatou o desarranjo estrutural dos podócitos e acelerou a reversão do apagamento dos pedicelos, através da modulação da autofagia e a via mTOR (Gomes et al., 2018; Rangel et al., 2018). As células ckit a semelhança das mesenquimais também atua por mecanismos parácrinos e podem ser responsáveis pela regeneração renal, estimulando a proliferação de células renais sobreviventes.

1.3 Estudos sobre células C-KIT em humanos

Fase embrionária e fetal.

Em humanos, as células-tronco embrionárias também expressam o receptor C-KIT (Hoffman & Carpenter, 2005) e no rim fetal, as células C-KIT são encontradas em níveis moderados nas células epiteliais do túbulo proximal e alça de Henle, em níveis menores e focais nos túbulos distais, e foram negativos em corpúsculos renais e túbulos coletores (Miliaras, 2004).

Por outro lado, outros autores relataram a ausência de células c-Kit em rins fetais humanos (Metsuyanim et al., 2009). As células c-Kit representam 1% das células do líquido amniótico e exibem propriedades de células-tronco, como clonogenicidade e multipotencialidade (de Coppi et al., 2007). Vale ressaltar que o líquido amniótico humano abriga células tubulares epiteliais renais que foram descoladas de rins

embrionários e fetais e que essas células reparam rim de camundongos após lesão de isquemia-reperfusão (Perin et al., 2010). Sendo assim, estes dados claramente reforçam nossos resultados em animais. Não há dúvidas que faltam pontos ainda não esclarecidos da nefrogênese embrionária e fetal humana em relação ao papel das células c-kit durante o desenvolvimento renal e isto requer uma investigação mais aprofundada em estudos futuros.

1.4 C-KIT em adultos

A expressão do C-KIT também é mantida em humanos adultos rim e é expresso em níveis moderados no citoplasma de túbulos proximais e distais (Miliaras, 2004). No entanto, outros relataram ausência de células C-KIT em rins adultos (Lammie et al., 1994). Estes dados polêmicos podem ser atribuídos a diferentes técnicas de detecção C-KIT usando amostras embebidas em parafina. Com base na conservação entre espécies, hipotetizamos que, o rim fetal e de adultos humanos abrigam uma população de C-KIT (progenitor/células-tronco) e exibem clonogenicidade, capacidade de autorrenovação, multipotencialidade, e potencial regenerativo. Para provar esta hipótese, o nosso grupo, colaborou com o grupo da Prof.^a Érika B. Rangel em um estudo de isolamento de células C-KIT de biópsias renais humanas de 12 casos de doadores falecidos. As células c-Kit foram encontradas positivas em 3,6% das células renais humanas adultas pela citometria de fluxo e ainda conseguimos expandi-las *in vitro* e depois purificá-las através do “cell sorting” usando citômetro de fluxo (Gomes et al., 2018).

Portanto, estes dados corroboram a existência da permanência deste progenitor renal na vida adulta e isto abre sem dúvida possibilidades de testes pré-clínicos e clínicos em doenças renais humanas.

Enquanto não temos testes em humanos e até o momento, essas células c-kit+Lin⁻ ainda não foram testadas em modelos de doença renal crônica, o objetivo principal do presente estudo é testar de forma pioneira a capacidade regenerativa das células c-kit+Lin⁻ isoladas de rim de ratos em modelo experimental de doença renal crônica (nephrectomia 5/6). A nossa hipótese central é a de que as células c-kit+Lin⁻ específicas do rim podem se diferenciar mesmo que em baixa porcentagem em podócitos, células tubulares e

endoteliais, além de agirem de forma parácrina reduzindo a fibrose túbulo-intersticial e diminuindo a albuminúria/proteinúria e, assim, retardando a progressão da DRC. Dessa forma, essas células tecido-específicas podem representar uma fonte alternativa de tratamento para as doenças renais. O nosso conceito inovador é que as células-tronco tecido-específica renais (c-kit+Lin-) podem ter uma capacidade regenerativa melhor do que as células-tronco mesenquimais extra renais.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial das células c-kit⁺Lin⁻ tecidos-específicas derivadas do tecido renal de ratos para tratamento da doença renal crônica no modelo de nefrectomia (Nx5%) e compará-las com células mesenquimais.

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliação do peso corporal e pressão arterial sistólica.
2. Avaliação dos níveis séricos de ureia e creatinina.
3. Avaliar as alterações físico-químicas dos compartimentos túbulo-intersticial e glomerular (osmolalidade, análises dos fatores de excreção de sódio, potássio e creatinina urinária, proteinúria e albuminúria).
4. Avaliar marcadores teciduais de fibrose e de integridade dos compartimentos renais (glomérulos, túbulos e interstício).
5. Avaliação da expressão no tecido renal de marcadores para: proliferação celular (PCNA), Leucócitos (CD43), Macrófagos (CD68 e CD206) e Linfócitos (CD3).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Protocolos experimentais com animais

Todos os métodos que requerem manipulação de animais empregados na presente proposta contam com a aprovação do Comitê de Ética HC FMUSP. Este estudo possui aprovação de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) no protocolo nº 945/17 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.2 Animais

Foram utilizados 40 animais ratos Wistar, machos, com peso inicial de 200g a 320g, entre 6 a 10 semanas de vida. Os animais foram obtidos de uma colônia do Biotério Central do ICB (Instituto de Ciências Biomédicas). Todos esses foram mantidos em biotério com temperatura e umidade do ar controlada.

Todos os animais ao serem admitidos neste projeto, receberam código único e foram devidamente acompanhados e monitorado em prontuário (Figura 6), onde todas as alterações clínicas, laboratoriais e comportamentais foram registradas

3.3 Modelo de nefrectomia ou ablação renal 5/6

O modelo experimental de ablação 5/6, caracterizado por nefrectomia do rim direito e infarto de dois terços do rim esquerdo, tem sido um dos modelos mais utilizados para estudar a progressão da doença renal. Dois aspectos deste modelo merecem especial atenção: o primeiro aspecto é na fase inicial, onde se observa uma profunda alteração hemodinâmica; e o segundo aspecto é na fase tardia, na qual se desenvolve uma síndrome de hipertensão sistêmica e glomerular, proteinúria e glomeruloesclerose progressiva. Essa intensa glomeruloesclerose resulta na falência funcional do rim remanescente. Assim, o modelo de ablação renal 5/6 constitui um importante modelo para o estudo, não apenas

dos mecanismos patogênicos como também para avaliar possíveis e novas intervenções terapêuticas.

A nefrectomia 5/6 consiste em um procedimento cirúrgico onde a função renal é drasticamente diminuída (dividindo-se o rim em 6 partes, duas partes são infartadas e outras três são removidas). Essa técnica cirúrgica consiste em realizar a ligadura das ramificações posterior e superior da artéria renal do rim esquerdo (figura 3), causando neste rim um infarto de dois terços e nefrectomia unilateral do rim direito (Anderson et al., 1985).

3.4 Anestésico

Para a realização do procedimento, foi feita inicialmente a indução da anestesia. Para isso os animais foram colocados em uma caixa de contenção para o adormecimento dos mesmos com uma vazão de 5 ml/L de isoflurano. Após essa primeira sedação, os animais foram recolocados na bancada onde foram feitas as cirurgias para o sistema de apoio com a máscara de anestesia própria para roedores, onde a vazão de isoflurano foi reduzido para 1 ml/L (Cristália, São Paulo, Brasil), por via inalatória, em sistema de anestesia com regulação de vazão de anestésico e oxigênio (Harvard *Apparatus*, Massachusetts, EUA).

3.5 Procedimento cirúrgico

3.5.1 Nefrectomia 5/6

Os animais foram pesados, anestesiados e imobilizados na posição decúbito dorsal, e suas patas imobilizadas. (Figura 3A e 3B).

Antes de começar o procedimento, foi confirmado o grau de sedação (leve, muito leve, profunda e boa) dos animais. Para a confirmação, utilizamos uma pinça dente de rato, pressionando levemente a pata do animal, e somente na ausência do reflexo à dor o procedimento teve continuidade.

O abdômen do animal foi higienizado com clorexidina degermante (figura 3B) formando um campo estéril para a realização da laparotomia, posicionando o afastador

com espaço de aproximadamente 5 a 8 cm (Figura 3F), com auxílio de duas gazes, o intestino delgado e grosso foi posicionado levemente para o quadrante direito do abdômen do animal, expondo assim o rim, as compressas de gazes foram umedecidas com solução fisiológica. Com o rim esquerdo exposto, foi realizada a ligadura (usando fio algodão 4.0) da ramificação arterial posterior e da anteroinferior e observado a mudança da coloração do rim (Figura 3G e 3H).

Após o procedimento da laqueadura, ambas as compressas de gaze foram removidas, reposicionadas em direção do quadrante esquerdo do abdômen, essas foram irrigadas novamente com solução salina. Em seguida, foi feita a exposição do rim direito do animal, seguido da ligadura na região do pedículo renal seguida pela nefrectomia. (Figura 3I). As vísceras do animal foram reposicionadas na cavidade abdominal, hidratadas com solução fisiológicas, e realizado o fechamento da camada muscular com fio *catgut* 4.0 (Figura 3K) e a camada de pele com o fio *nylon* 3.0 (Figura 3L). Para a finalização do procedimento cirúrgico, foi feita a higienização com álcool iodado sobre o ferimento (Figura 3M).

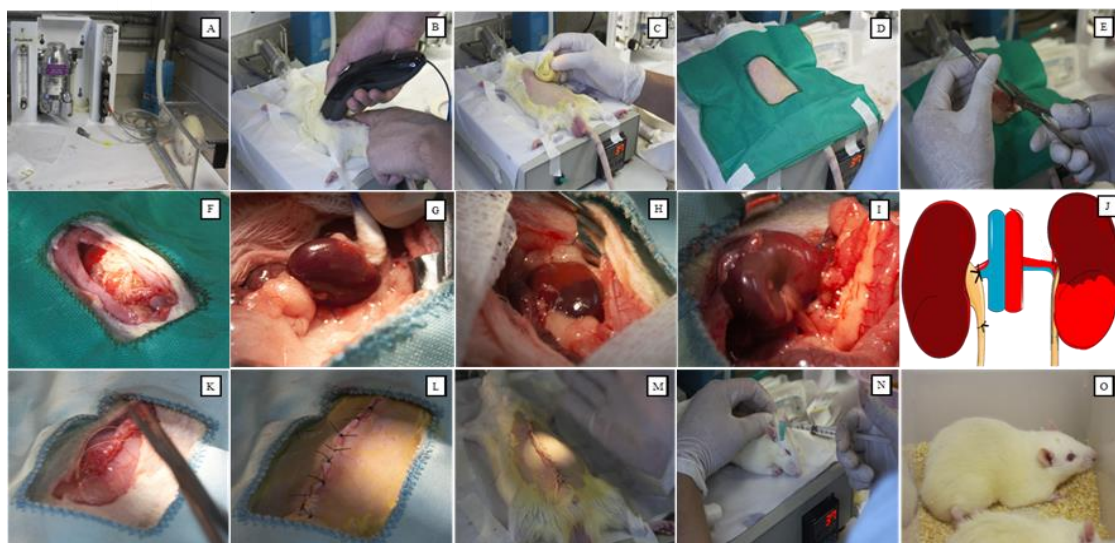


Figura 3 - Para a realização do procedimento cirúrgico os animais foram A) anestesiados com isoflurano; B) realização da tricotomia da região abdominal; C) realização da assepsia; D) posicionamento do campo cirúrgico; E) abertura da cavidade abdominal, F) sendo realizado o afastamento das vísceras abdominal, seguida pelo fechamento da ramificação posterior da arterial renal, G) evidenciado pela isquemia da região no momento da ligadura H) foi realizado a ligadura da ramificação anterior inferior, I) após esse procedimento o rim direito foi exposto e realizado a nefrectomia unilateral, conforme J) ilustração detalhada do procedimento de Nx^{5%}. K) realizado o fechamento da camada L) muscular M) pele, seguido por N) analgesia do animal. O) Os animais foram monitorados em gaiola com maravalha sobre a cama térmica a 37°C. (fotos de Sabrina Senne).

3.5.2 Injeções subcapsular renal das células c-kit⁺Lin⁻ e MSC derivadas de tecido adiposo

No 15º dia após o procedimento de Nx5%, os animais foram pesados, anestesiados e imobilizados na posição decúbito lateral esquerdo.

A região lombar do animal foi higienizada com clorexidina degermante, (Figura 4A) realizada a formação de campo estéril com gazes e realizada a lombotomia (Figura 4B), com exposição do rim esquerdo (Figura 4C); sendo, então, inoculadas, na região subcapsular, 10µl de PBS contendo 1x10⁶ das células c-kit⁺Lin⁻ ou 1x10⁶ das células MSC. A inoculação das células foi realizada com o auxílio de um capilar de plástico estéril colocado sob a cápsula renal e as células foram injetadas com o auxílio de um micro injetador (Figura D e E). A incisão da lombotomia do animal foi suturada com fio de seda 5,0 (Figura F).

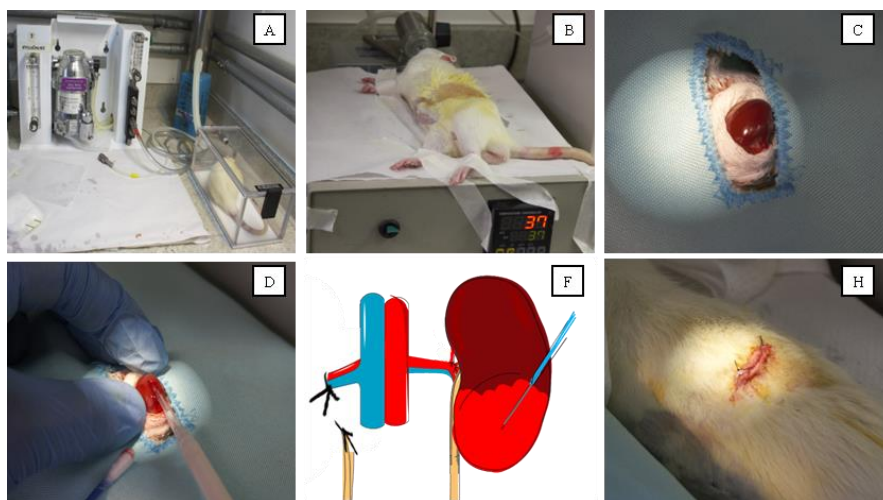


Figura 4.- A) inoculação das células foi realizada após a anestesia dos animais com isoflurano. B) esse foi imobilizado na posição decúbito lateral direito, C) o rim do animal foi isolado e D) inoculado 10µL de solução contendo 1x10⁶ de células. E) Esquema representativo demonstrando a inoculação das células, após inoculação a cavidade lombar foi fechada a camada muscular e de pele, F) imagem representando o aspecto da lesão no momento da inoculação das células (fotos de Sabine Senne).

3.5.3 Pós-operatório

Os animais foram colocados em gaiolas sobre uma cama térmica a 37°C. Assim que o animal acordava, foi feita a administração de cloridrato de tramadol 50mg/ml na dose de 5 mg/kg, subcutâneo (SC). Os animais foram monitorados por 2 horas e depois encaminhados para o biotério. O tramadol foi administrado de 8 em 8 horas por 3 dias após o procedimento cirúrgico.

3.5.4. Eutanásia

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico 100mg/ml, administrado na dose de 30mg/kg por via peritoneal (IP).

As carcaças dos ratos eutanasiados foram colocadas em sacos específicos para descarte de material biológico e mantidas a -20°C até a retirada pelo Programa de Gerenciamento de Resíduos do Serviço de Saúde (PGRSS) da FMUSP. Todos os resíduos químicos e biológicos utilizados no procedimento, assim como todos os materiais perfurocortantes, foram acondicionados em recipientes apropriados até a coleta pelo PGRSS.

3.6 Células c-kit⁺Lin⁻ tecido-específica de ratos neonatos e células mesenquimais derivadas de tecido adiposo de rato

As células c-kit⁺Lin⁻ foram isoladas, caracterizadas, transfectadas com lentivírus GFP, expandidas e preservadas de acordo com o protocolo estabelecido no *Interdisciplinary Stem Cell Institute, University of Miami* (Rangel et al., 2013). Essas células que foram isoladas na Universidade de Miami (por ocasião do pós-doutorado da Prof.^a Dra. Samirah Gomes Abreu) e foram enviadas ao Brasil pelo nosso colaborador Internacional Prof. Dr. Joshua M. Hare. As células foram recebidas pela Profa. Dra. Érika Bevilaqua Rangel, no Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEP-HIAE) e, em colaboração com nosso laboratório (LIM 29-FMUSP), fizemos a expansão *in vitro*. Inicialmente, a expansão das células era feita no IIEP-HIAE e, posteriormente, no LIM 29. Tais células foram armazenadas em ambas as Instituições para projetos diversos.

As células-tronco mesenquimais foram obtidas de ratos machos adultos Wistar, sendo derivadas de tecido adiposo, isoladas, expandidas e caracterizadas. Após a eutanásia, o tecido adiposo subcutâneo inguinal foi removido, cortado em pequenas partes e digerido com colagenase tipo I 0,075% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 60 minutos a 37°C, em agitação constante. Após a completa digestão, o homogenato foi centrifugado por 5 minutos a 600g. O sobrenadante foi removido e o pellet ressuspense em 5mL de PBS e filtrado através de filtros de 100 e 40 µm. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos a 600g e, por fim, o pellet foi ressuspense em meio DMEM-Low com soro fetal bovino 10%, antibióticos Penicilina e Streptomina (1%), plaqueado em frascos para cultura de 25cm³ e mantido em estufa úmida a 37°C. O meio de cultura das células foi trocado no dia seguinte à extração e a cada dois dias. Quando as células atingiram a confluência de 80%, foram tripsinizadas (Trypsina 0,25% marca Gibco - 15050-057) e passadas para nova expansão, até que se tornaram homogêneas para melhor caracterização.

A caracterização das populações celulares presentes nas amostras de MSC de tecido adiposo foi determinada pelo método de citometria de fluxo. Após a 3^a ou 4^a passagem, as células foram submetidas à contagem e análise da viabilidade por solução de Tripán Blue (Sigma-Aldrich, Sto. Louis, EUA), e a pureza da população foi avaliada com anticorpos CD90, CD73, CD45 e CD44. Controles de marcações inespecíficas foram utilizados para a adequada calibração do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra. Todos os anticorpos foram obtidos da empresa eBioscience (San Diego, CA, EUA). As células foram ajustadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ em 100µL e transferidas para um tubo específico de citometria (Becton Dickson, San Jose, CA, EUA), previamente identificadas e incubadas com os anticorpos conjugados aos fluorocromos por um período de 30 minutos, em campo escuro a temperatura ambiente. Em seguida, foi acrescentado 1mL de PBS gelado e centrifugadas a 2000rpm por 6 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular homogeneizado e ressuspense em 500µL de solução paraformaldeído 2% e, assim, estocado na geladeira ao abrigo da luz até o momento da leitura no citômetro, com prazo máximo de 24 horas para a leitura. A intensidade da fluorescência foi lida no BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e os dados foram analisados no CELLQuest™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Para cada amostra foi realizada uma aquisição de 20.000 eventos. Os resultados foram analisados

na forma de histograma e em percentual da população celular com reação positiva para cada anticorpo.

Para a caracterização do potencial de diferenciação das MSC, foram utilizados kits comerciais de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica. Foram plaqueadas 5×10^3 células por poço e incubadas com meio de crescimento por aproximadamente 4 dias. Quando atingiram a confluência de 80%, foram incubadas com meios de diferenciação específicos por 14 dias. Terminado esse período, as células foram fixadas e reveladas com marcações específicas para cada tecido.

3.7 Grupo de estudo

Para a execução deste projeto, foram utilizados 40 ratos Wistar machos, divididos em quatro grupos:

1. Grupo sham (**n=8**): realizada a abertura da cavidade abdominal, com pouca movimentação nos tecidos renais e realizado o fechamento do abdômen.

2. Grupo Nx5% (**n=10**): realizado o procedimento de nefrectomia 5/6 já descrito anteriormente.

3. Grupo Nx+C-KIT (**n=10**): realizado o procedimento de nefrectomia 5/6 já descrito anteriormente e, no 15º dia após a cirurgia, os animais foram submetidos a novo procedimento cirúrgico para inoculação na cápsula renal de 1×10^6 de célula c-kit⁺Lin⁻, de acordo com o protocolo também já descrito anteriormente.

4. Grupo Nx+MSC (**n=10**): realizado o procedimento de nefrectomia 5/6 já descrito anteriormente e, no 15º dia após a cirurgia, os animais foram submetidos a novo procedimento cirúrgico para inoculação na cápsula renal de 1×10^6 de célula MSC, de acordo com o protocolo também já descrito anteriormente.

Os animais foram estudados no 0, 15° e 30° dia após o procedimento para análise de peso, pressão arterial caudal (PAC) e coleta de urina por 24 horas. No 30° dia foi realizada a eutanásia, coleta de sangue (coleta via punção cardíaca) e coleta de tecido para análise histológica. (Figura 5)

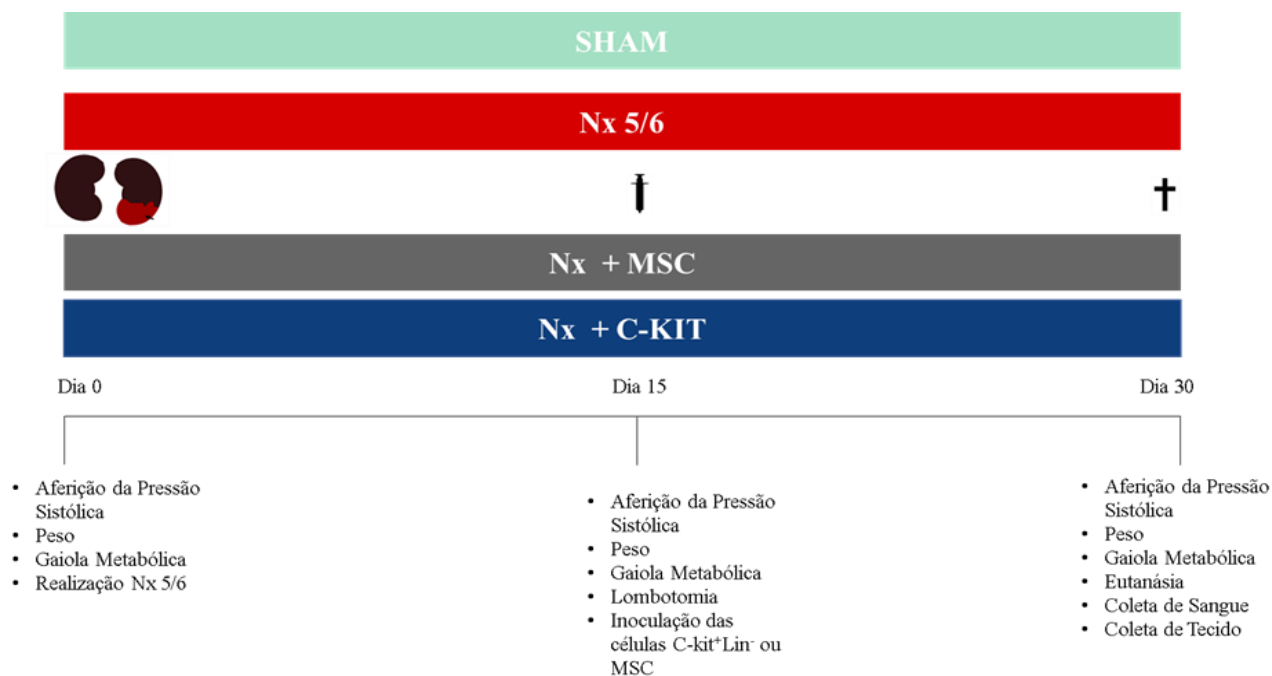


Figura 5 - Esquematização da distribuição dos animais

Todos os animais foram mantidos vivos pelo período de 30 dias no biotério. Eles tinham prontuário (Figura 6) individual e eram mantidos em gaiolas com no máximo 3 animais por gaiola.

PRONTUÁRIO									
GRUPO									
RESPONSÁVEL		Felipe Lima de Souza							
ID ANIMAL		Dt Nasc		Dt da Cirurgia		Dt da Terapia		Dt eutanásia	
SEXO	Macho	Peso Dia 0			Anestesia cirurgia			Anestesia eutanásia	
		Peso Dia 15			Anestesia inoculação			Anestesia eutanásia	
		Peso dia 30			Anestesia eutanásia			Anestesia eutanásia	
		Eutanásia			Anestesia eutanásia			Anestesia eutanásia	
Data: 00/01/1900									
Planilha de Monitoração da Anestesia (Anotar pelo menor e cada 15 minutos)									
Nível de Anestesia	Início	15 min	30 min	45 min	60 min				
Profundidade da Anestesia									
Respiração									
Membranas mucosas faríngeas									
Pár - Operatória					Direita				
Início	termina	T-cama	Opióide	vL utilizada					
Observação da Procedimento Cirúrgica									
Observações do Pós-operatório									
Data	Horário	Hidratação	Aspecto da lesão	Avaliação da dor	Conduta terapêutica	VL	Via (VO, IV, IP, IM, SC)	OBSERVAÇÕES	
__/__/__									
__/__/__									
__/__/__									

Figura 6 - Modelo de prontuário para registro individual dos animais do estudo

3.8 Pressão arterial caudal – PAC

A pressão arterial sistólica foi aferida nos intervalos de 0, 15° e 30° dias. Para cada intervalo, as aferições foram feitas durante três dias consecutivos e cinco aferições em cada dia. Somente a média das PAC obtidas no terceiro dia foi considerada a “pressão verdadeira”, e somente as aferições em que os animais não apresentaram movimentos foram consideradas para análise. A análise gráfica foi feita utilizando o sistema BP-2000 (BP-2000 – *Visitech Systems*, Carolina do Norte, USA), compatível com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Antes de cada aferição, os animais eram deixados em caixa térmica com temperatura média de 45°C por 30 minutos sem água e com comida. A aferição era obtida pelo equipamento acoplado ao transdutor de pressão (BP-2000 – *Visitech Systems*, Carolina do Norte, USA).

3.9 Gaiola metabólica

Todos os animais foram deixados em gaiola metabólica (GM) (Tecniplast, Thermo Fisher, Massachusetts, EUA). A GM foi montada conforme as instruções do fabricante. Os animais foram pesados antes de entrar na GM, mantidos com 200 mL de água filtrada, e aproximadamente 400 g de ração triturada (Nuvilab, Quintia, Paraná, Brasil), acrescentada coletor de descarte de fezes e urina.

Após 24 horas, os animais foram retirados da GM, pesados sendo devolvidos para gaiola comum, com ração e água a vontade. O consumo de água e urina deste período foram aferidos com auxílio de uma proveta graduada, os dados foram registrados isoladamente nos prontuários dos animais. A urina produzida foi enviada para o laboratório. As fezes e ração foram descartadas.

3.10 Bioquímica

3.10.1 Creatinina Sérica

A medida de creatinina sérica foi obtida utilizando o kit comercial (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Brasil).

3.10.2 Ureia Sérica

A medida de ureia sérica foi obtida utilizando o kit comercial (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Brasil), sendo um teste enzimático colorimétrico.

3.10.3 Clearance de Creatinina

O ritmo de filtração glomerular foi feito utilizando a fórmula já conhecida na literatura. O resultado é dado em mL/min/100g

$$\text{Clearance de Creatinina} = \frac{\text{Cr}_{\text{urínaria}} \times v_{\text{Lurinário}}}{1440 \text{ min}} \times \frac{\text{Cr}_{\text{sérica}}}{\text{Peso (gramas)}}$$

Onde:

$\text{Cr}_{\text{urínaria}}$: a concentração da creatinina urinária

$v_{\text{Lurinário}}$: volume urinário nas 24 horas (em mL)

$\text{Cr}_{\text{sérica}}$: a concentração da creatinina sérica.

3. 10.4 Carga excretada de eletrólitos

O sódio e potássio plasmáticos e urinários foram dosados utilizando o método eletrodo seletivo Easylyte (Medica Corporation, Massachusetts, EUA). Com os resultados obtidos, foram realizados a porcentagem da carga excretada.

Para realização da carga excretada foram realizadas a multiplicação do sódio e potássio pelo volume urinário em 24 horas, e o resultado foram expressos em porcentagem.

3.11 Uroanálise

As amostras urinárias coletadas foram mensuradas e homogeneizadas. Para a análise, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm.

3.11.1. Proteinúria

Para a dosagem de proteinúria foi utilizado o kit comercial Sensiprot® (Labtest Diagnóstico, Lagoa Santa, Brasil), pela metodologia de vermelho piragalol.

3.11.2 Albuminúria

A albuminúria foi quantificada através da metodologia de imunodifusão radial (IDR). Para realizar esta técnica utilizamos placas de gel de agarose. As placas de gel foram preparadas misturando 3ml de agarose a 2% (a 55° C) com 3ml de uma solução de anticorpo anti-albumina de rato (Cappel, Aurora, OH, EUA) diluído a 1:30 em Tampão Tris-Barbital 0,06M pH 8,8 a 55° C. A solução homogeneizada a 55°C e 1,25ml desta solução foi colocada em uma placa de IDR para 6 poços em uma base plana. A agarose então solidificada a 4°C, por aproximadamente 4 horas em câmara úmida.

Cada poço foi perfurado e preenchido com 7,5µL de amostras de urina (pura ou previamente diluída em soro fisiológico), sendo que 3 poços foram preenchidos com padrões de albumina de rato a 2,5mg%, 10mg% e 20mg%. A placa foi coberta com tampa de acrílico e colocada por 24 horas em câmara úmida em geladeira a 4°C.

O halo formado em torno do poço foi medido com régua apropriada, que fornece o quadrado do diâmetro do mesmo em leitura direta. Sendo construída uma curva padrão relacionando-se o quadrado do diâmetro observado com a concentração do padrão correspondente, através de regressão linear. A leitura do quadrado do diâmetro obtido para cada amostra foi anotada na curva padrão, obtendo-se a concentração da amostra em mg% de albumina de rato.

3.12. Osmolalidade

Para a análise da osmolalidade foi utilizado o osmômetro (Advanced Instruments Modelo 3W2 Source equipamento Científicos, Ontario, Canadá).

3.13 Avaliação histológica

No final do período de 30 dias os animais eram anestesiados e eutanasiados e o fragmento do tecido renal removido. Esses fragmentos foram identificados e colocados em cassetes e mergulhados em formol 4%.

O processo de parafinização foi realizado pelo processador automático de tecidos “histokinette” (Jung-Histokinette 2000 Leica, Alemanha) com duração de 14 horas. O processo foi iniciado pela desidratação dos tecidos em álcool com concentrações progressivas (álcool 50%, álcool 70%, álcool 96%, álcool absoluto), e foi feita a diafanização passando o tecido de solução de álcool absoluto em três banhos de xilol. Os tecidos foram, então, imersos em parafina fundida a 60°C, colocados em blocos e permaneciam em temperatura ambiente até o endurecimento.

Os blocos de parafina foram deixados por 30 minutos a -20°C e, em seguida, os tecidos foram cortados em micrótomo (Reicher Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha), com navalha descartável. Os fragmentos, com espessuras de 3 a 4 µm foram aderidos às lâminas.

Para a realização das técnicas histológicas, foi realizada a desparafinização dos tecidos. Para isso, as lâminas foram deixadas por 2 h em estufa a 60°C e recebiam 2 banhos de 9 minutos de Xilol. Em seguida, as lâminas foram desidratadas com 2 banhos de 5 minutos de álcool absoluto e 2 banhos de 3 minutos de álcool 96%. No fim do processo, as lâminas foram lavadas em água destilada e processadas de acordo com a técnica histológica.

Os achados histopatológicos foram avaliações e classificações pela professora Dr^a Juliana Reis Machado e Silva, do centro de pesquisa em rim (Cerim) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro do setor de patologia geral especialista em alterações renais.

3.13.1 Coloração de Tricrômico de Masson

Para esta técnica, as estruturas celulares são coradas: o núcleo em preto, o citoplasma em vermelho e as fibras de colágeno em azul. Para a execução desta técnica, as lâminas após desparafinização eram imersas em hematoxilina de Harris por 5 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente e submersas em Cromotrop por 5 minutos. Após isso, elas passam por um novo processo de desidratação (álcool 70%, álcool 96%, 2 vezes em álcool absoluto e 2 vezes no xilol) e, a seguir, era feito a montagem utilizando Permount.

Para analisar o grau de expansão intersticial renal, foi utilizada a técnica de sistema de contagem de pontos. Para essa técnica foi utilizado um sistema de microscópio acoplado a um monitor de vídeo, com fator de correção de em $0,388\text{mm}^2$.

3.14 Imunohistoquímica

3.14.1 Recuperação de epítomos

Com o objetivo de aumentar a expressão antigênica, após a desparafinização as lâminas eram imersas em tampão citrato 10Mm, pH 6,0 e levadas em forno micro-ondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2400 watts durante 15 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, as lâminas eram lavadas com água destilada para a retirada do tampão citrato e transferidas para TBS (*tris buffered saline*), pH 7,6.

Para o bloqueio da biotina endógena, os cortes eram incubados com solução de avidina (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 minutos, e posteriormente lavados com TBS durante 5 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com uma solução de biotina (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 minutos e posteriormente lavados com TBS por 5 minutos. Os cortes foram incubados com *Protein block* (Spring Bioscience, Pleasanton, EUA), diluído 70 vezes em TBS, durante 30 minutos e, após a retirada do excesso do soro, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-CD43 (1:50) (Serotec, Raleigh, EUA), Anti-PCNA (DAKO, Carpinteria, EUA) (1:10.000), anti-CD3 (1:50) (abcam, Cambridge, UK) *overnight* em câmara úmida a 4°C.

3.14.2 Revelação

Para o processo de revelação, os cortes foram incubados com uma solução contendo substrato para a enzima fosfatase com o corante *FAST-RED* (SIGMA CHEMICAL, Saint Louis, EUA), preparados da seguinte maneira: 1 mg de fosfato de

Naftol AS-MX (SIGMA Chemical, Saint Louis, EUA) diluído em 100 mL de Dimetilformamida (MERCK, Darmstadt, Alemanha). E, em seguida, a solução foi diluída em 4,9 ml de tampão TRIS 0,1M (pH = 8,2) e 10 mL de Levamisol 1M (Sigma Chemical, Saint Louis, EUA). Essa solução permaneceu armazenada a -20°C e, no momento da revelação, foi misturada ao corante FAST-RED (5 mg).

A revelação foi realizada sob microscopia (aumento de 100x) e a coloração avermelhada representa células positivas. O tempo de revelação foi de aproximadamente 10 minutos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer (MERCK, Darmstadt, Alemanha) durante 1 minuto, lavadas em água destilada e montadas com Glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Foram analisados 25 campos (aumento de 400X) para avaliar a marcação de leucócitos e PCNA no córtex e na medula, e o resultado foi expresso em células/mm².

3.15 Imunofluorescência

4.15.1 Recuperação de epítomos

Com o objetivo de aumentar a expressão antigênica, após a desparafinização, as lâminas foram imersas em solução de Tris (10mM) EDTA(1mM) pH = 9,0 e de Tween 0,05% e levadas ao forno de micro-ondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2400 watts durante 15 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com água destilada para a retirada do tampão citrato e transferidas para PBS (*Phosphate Buffer solution*), pH=7,6.

Para o bloqueio de proteínas inespecíficas, foi utilizada albumina bovina V 5% (BSA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) diluída em PBS por 30 minutos, em temperatura ambiente.

Após a retirada do excesso de soro, foi feita a dupla marcação para CD68 e CD206. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-CD206 (ABCAM, Cambridge, UK) diluído (1:800) em PBS e, ao mesmo tempo, foi utilizado o anticorpo primário monoclonal CD68 (Serotec, Raleigh, EUA) na diluição 1:50. A dupla marcação foi obtida deixando as lâminas em câmara úmida com os dois anticorpos durante a noite.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS por 10 minutos. Em seguida, foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados ao fluoróforo Alexa 546 anti-rabbit (Life Technologies, Carlsbad, EUA) para *anti-mouse receptor* (ABCAM, Cambridge, UK) e Alexa 488 *anti-mouse* para anti-CD68, diluídos em 1:200 por uma hora à temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram montadas com Prolong Diamond (Life Technologies, Carlsbad, EUA).

A coloração característica para a detecção de CD68 é a cor verde, e a coloração característica para a detecção de CD206 é vermelha. Para avaliação de CD68 e CD206 foram analisados 25 campos no aumento de 400 vezes.

3.16. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm SEM (erro médio padrão). As análises estatísticas foram baseadas na comparação dos grupos, utilizando-se para os cálculos o *software Graphpad Prism Versão 8.01* (Graphpad Software, La Jolla, EUA). As diversas variáveis foram testadas para normalidade e, em caso positivo, foi aplicado o teste *one way ANOVA*, com pós-teste de Tukey's na presença de diferença estatística

Os quatro grupos (sham, Nx^{5%}, Nx+MSC e Nx+C-KIT) foram comparados nos tempos 0, 15 e 30 dias. Cada grupo foi também comparado entre si nos diversos tempos 0, 15 e 30 dias. Foi considerado estaticamente significativo quando o valor de *P* foi menor que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Validação do modelo de Nx^{5%} em ratos Wistar

Visando comprovar que o modelo de DRC experimental funcionou, 10 animais foram randomizados por sorteio em grupo sham (n=4) e Nx^{5%} (n=6). Esses animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico no dia 0 e acompanhado pelo período de 15 dias, onde foi realizada a medida da pressão arterial e depois a eutanásia para as avaliações das alterações bioquímicas e histológicas. Nossos resultados (Tabela 1) após 15 dias de indução da DRC confirmam o modelo de doença com a presença de perda ponderal dos animais doentes assim como aumento da pressão arterial caudal, poliúria, aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina, perda do clearance de creatinina, presença de proteinúria e albuminúria. Adicionalmente avaliamos a presença de fibrose intersticial no tecido renal desses animais (Figura 7).

Tabela 1 -. Avaliação do perfil nos animais no 15^o dia após a Nx^{5%}

	sham	Nx ^{5%}
peso (gramas)	327 ± 13,1	277 ± 8,1*
PAC (mmHg)	150 ± 4,6	180 ± 4,3*
vL de água ingerido (mL/24h)	32,5 ± 2,8	61,4 ± 9,0
vL de urina (mL/24h)	33 ± 2,8	44 ± 8,2*
Ureia (mg/dL)	60,9 ± 7,1	113,7 ± 12,7*
Creatinina (mg/dL)	0,6 ± 0,5	1,3 ± 0,3*
Clearance de Creatinina (mL/min/100g)	0,03 ± 0,01	0,013 ± 0,001*
Proteinúria (mg/24h)	12 ± 2,1	48 ± 10,6*

p<0,05. sham (n=4) versus o grupo Nx^{5%} (n=6)

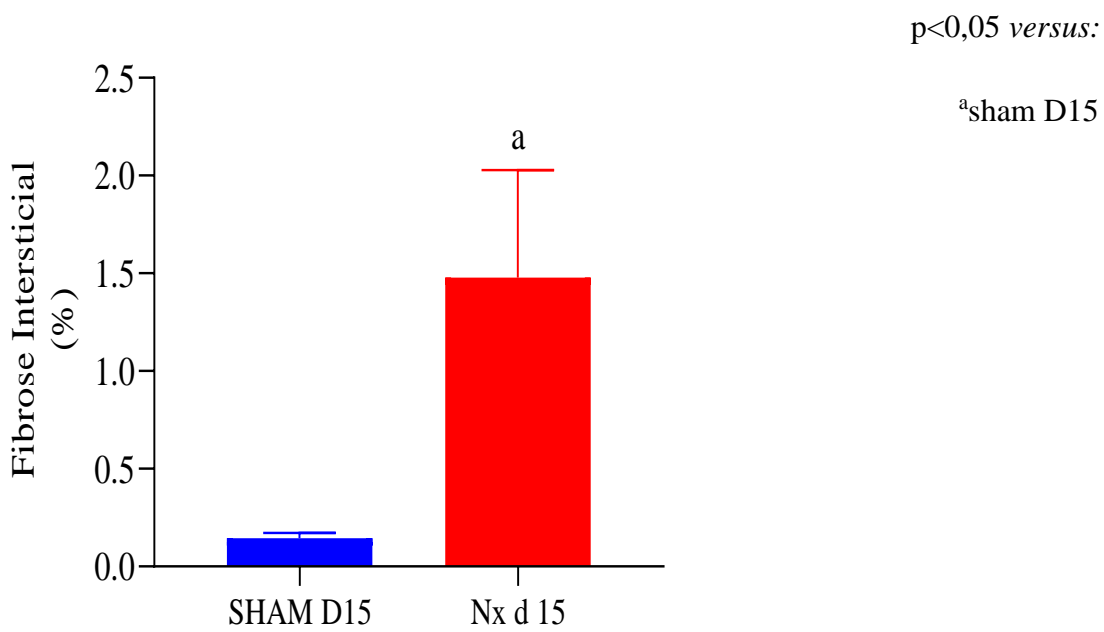
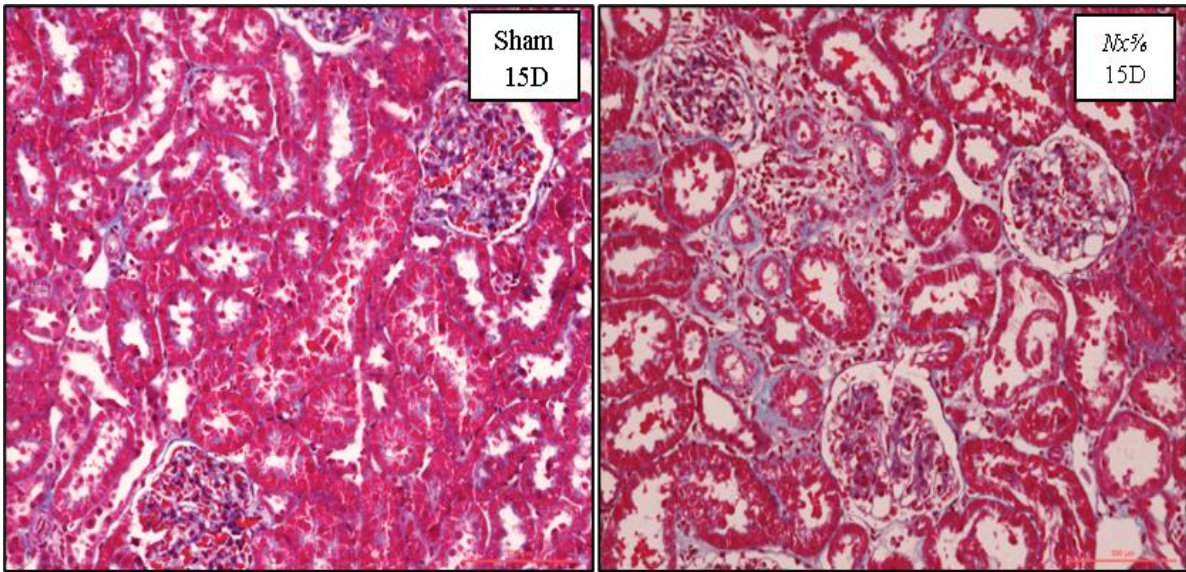


Figura 7 Análise da fibrose intersticial após 15 dias da Nx5%. É possível observar maior porcentagem de fibrose Intersticial no grupo Nx5% quando comparado ao grupo sham (aumento de 200x) (^a $p < 0,05$).

4.2 Diferenciação celular

As MSC derivadas do tecido adiposo foram extraídas conforme descrito na metodologia deste trabalho, consideradas pela técnica de aderência ao plástico e, quando estimuladas *in vitro*, se diferenciam nas linhagens adipogênica (Figura 8B), osteogênica (Figura 8C) e condrogênica (Figura 8D).

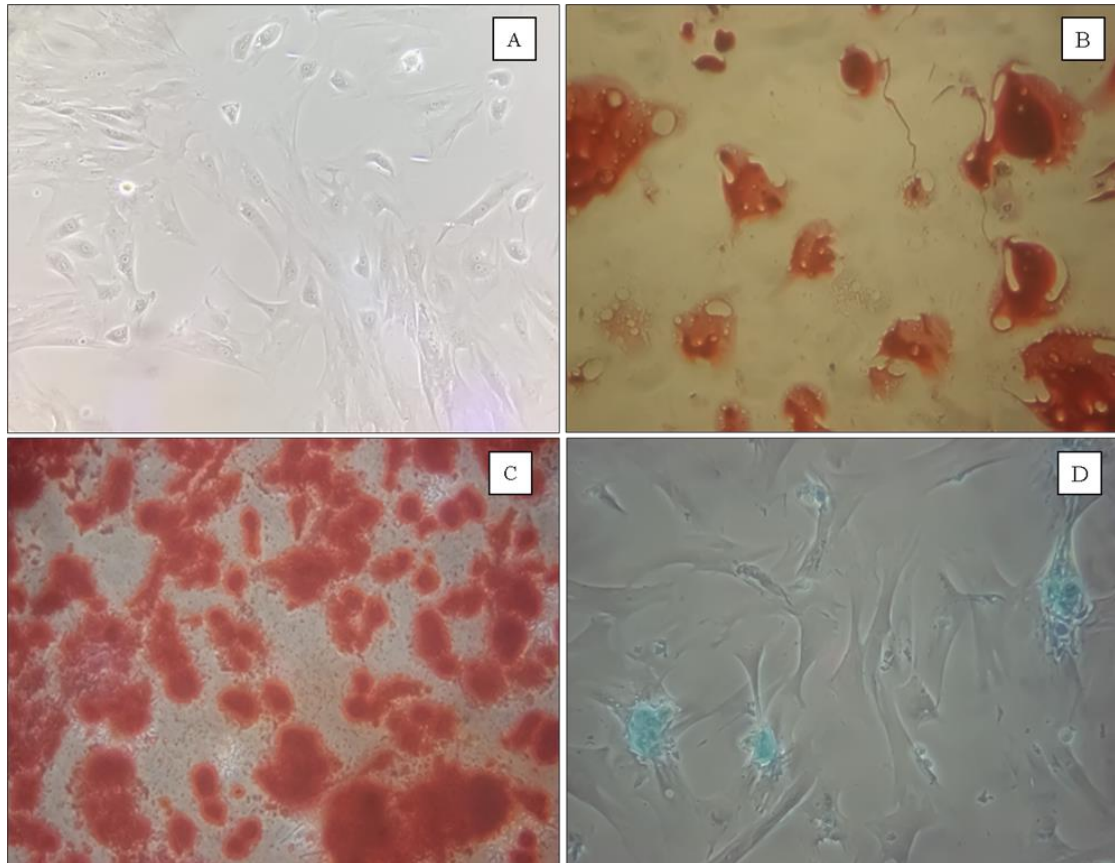


Figura 8- A) Imagem representativa das células com características fusiformes durante o cultivo celular (400X). Ensaio de Caracterização e diferenciação: B) adipogênica, com presença de vacúolos lipídicos após a coloração de *oil-red*; C) osteogênica após coloração em vermelh (*alizarin red*) e D) condrogênica, com presença de matriz extracelular detectada pela coloração de *Alcin Blue*.

4.3 Caracterização do perfil de população das MSC por citometria de fluxo

As MSC mantidas em cultura apresentam expressão de antígenos de superfície CD105, CD90 e CD44 (92%, 33% e 13% da população, respectivamente), e baixa expressão de CD45 (3%). Os resultados demonstram que a população de células apresenta imunofenotipagem característica das MSC. A imunofenotipagem está descrita abaixo em forma de histograma (Figura 9).

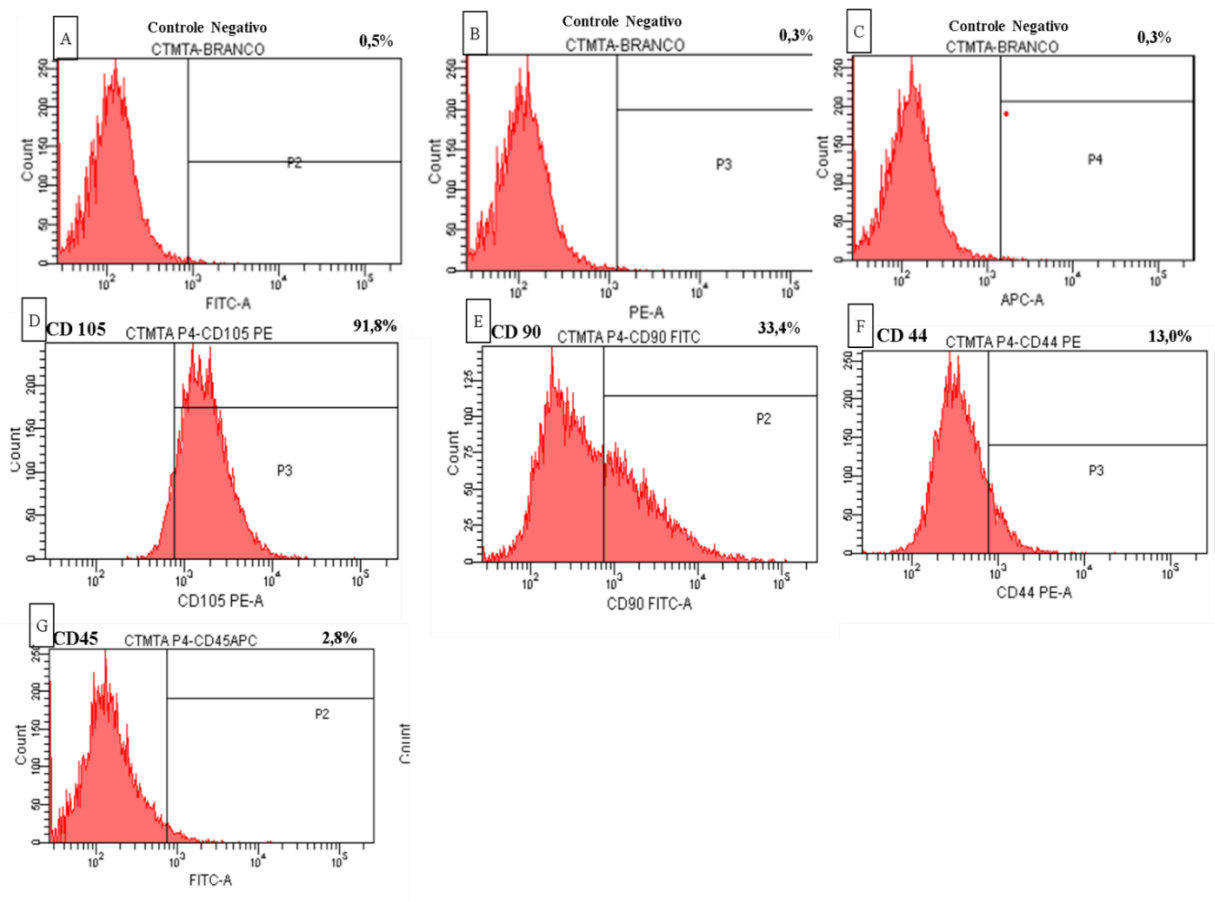


Figura 9 Caracterização de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo, de A, B e C) controle negativo, MSC foram positivas para D) CD105 E) CD90, F) CD44, e G) negativa para CD45.

4.4 Expansão das células c-kit⁺Lin⁻

As células c-kit⁺Lin⁻ foram descongeladas e expandidas conforme nosso protocolo (16), apresentando morfologia preservada e viabilidade superior a 80% no momento da expansão celular (Figura 10). Sendo esta, a mesma população de células já publicada por nosso grupo, descartamos a necessidade de repetição dos ensaios de diferenciação e caracterização destas células.

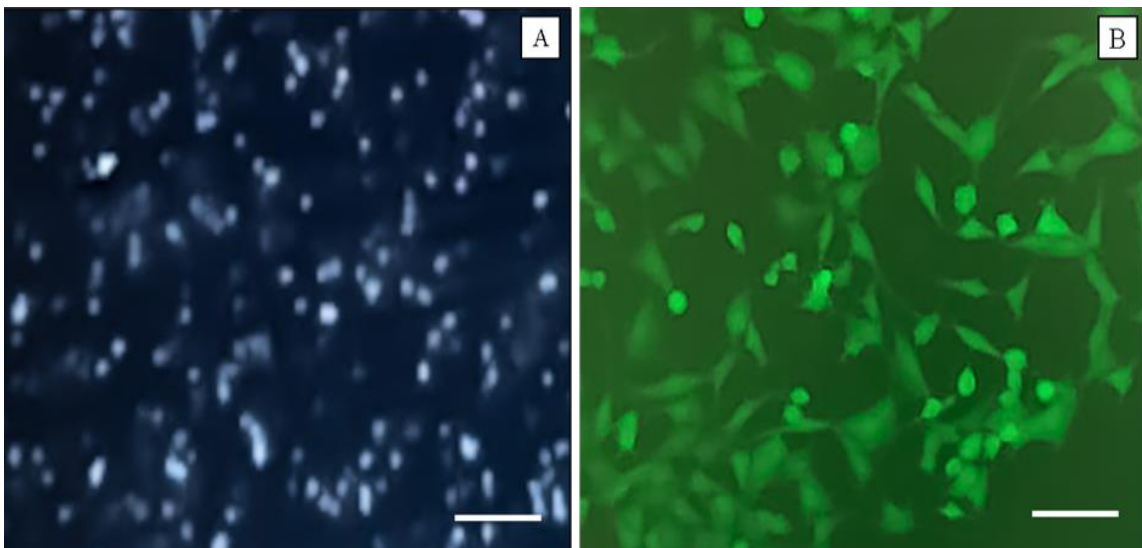


Figura 10 Aspecto das células c-kit⁺Lin⁻ no momento do descongelamento (aumento de 10X), em campo escuro; B) detecção da GFP nas células c-kit⁺Lin⁻

4.5 Viabilidade celular no momento da inoculação

As células MSC e as C-kit⁺Lin⁻ foram descongeladas no dia da inoculação, sendo quantificadas e verificadas a viabilidade celular (reagente Tripan blue). Ambas as populações de células apresentaram viabilidade maior ou igual a 90%. As doses de cada animal foram transportadas para a sala de cirurgia em recipiente com temperatura inferior a 8°C.

4.7 Sobrevivência

Utilizamos para este experimento 40 ratos *Wistar*, onde tivemos uma taxa de sobrevivência de 100% no grupo sham e um total de 73% dos animais com DRC e tratados. A predominância de óbito ocorreu na primeira quinzena do experimento (figura 11), com 11 óbitos no período e apenas 1 óbito após o décimo quinto dia. Não existiu causalidade entre a mortalidade e o tratamento com células-tronco conforme o teste de Log-Rank (mantel-Cox).

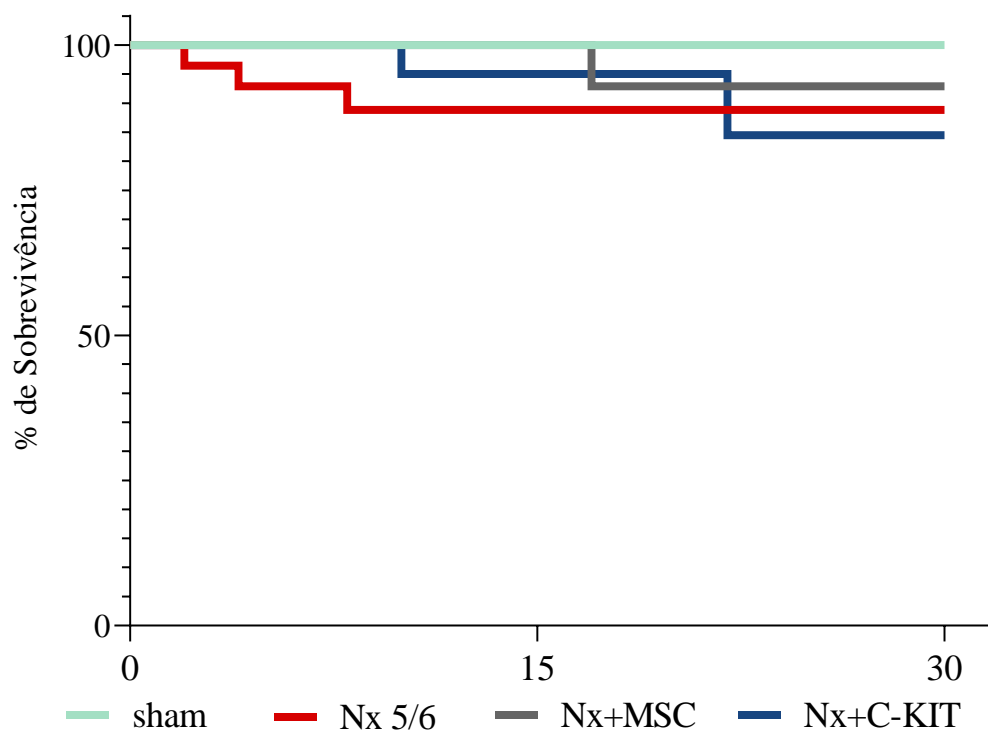


Figura 11 - Curva de sobrevivência nos diferentes grupos

4.8 Peso

O peso médio dos animais no início do experimento foi de $280 \pm 4,2$ gramas. Após o 15º dia, todos os animais submetidos à Nx^{5/6} apresentaram tendência à redução de peso corporal, e posterior recuperação no 30º dia. Ao avaliarmos a curva de peso, todos apresentaram ganhos proporcionais ao tempo de vida dos animais (Figura 12).

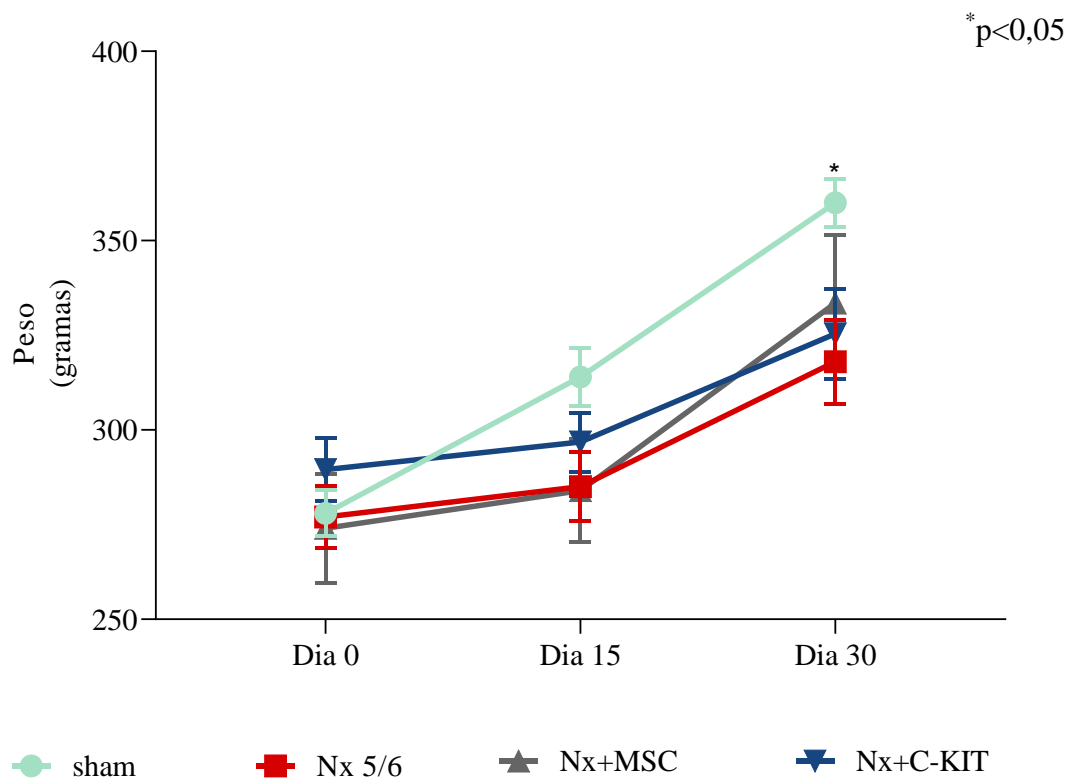


Figura 12 - Média de peso dos diferentes grupos ao longo de 30 dias.

4.9 Relação massa cardíaca a e peso corporal

Após a eutanásia dos animais, estes tiveram o seu tecido cardíaco e renal pesado, e o resultado foi calculado de modo a obter a relação da massa cardíaca e peso corporal. Observamos que os animais do grupo Nx^{5%} apresentaram aumento dessa relação, e ambos os grupos tratados apresentaram redução significativa da relação da massa cardíaca e peso corporal, embora essa redução ocorra de forma acentuada no grupo Nx + C-KIT (Figura 13)

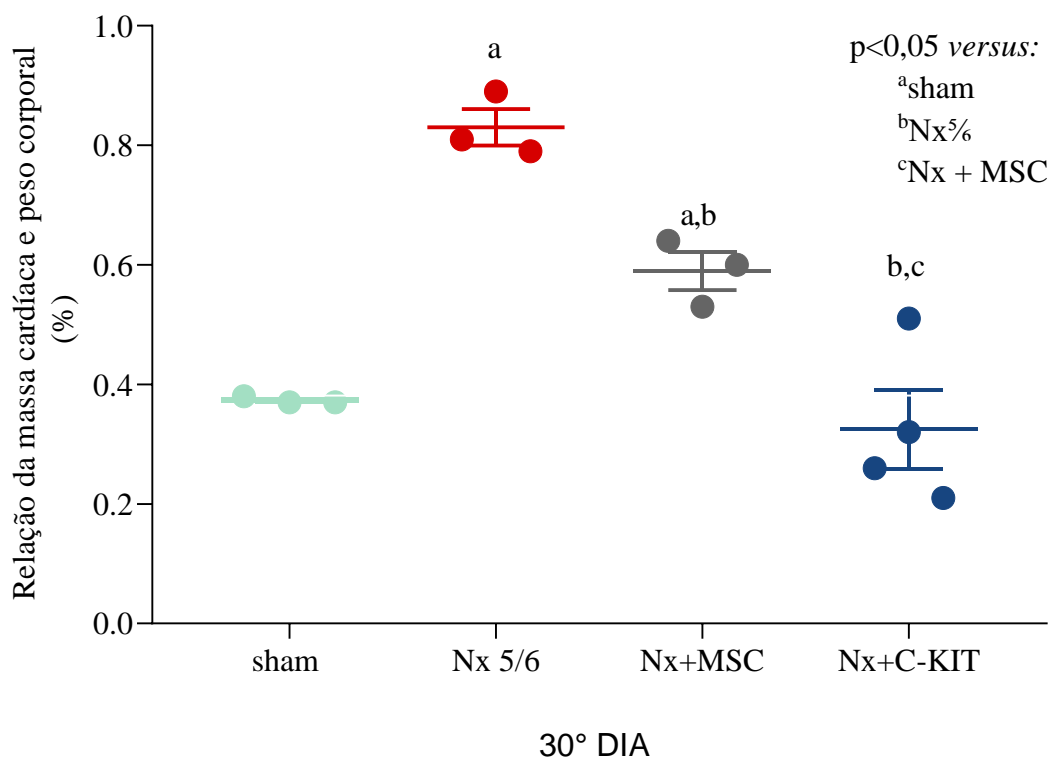


Figura 13 - Relação da massa cardíaca e peso corporal dos diferentes grupos chamando atenção para a melhora da relação da massa cardíaca e o peso corporal em ambos os tratamentos, porém, de forma mais acentuada no grupo que recebeu células C-KIT.

4.10 Relação da massa renal e peso corporal

Ao avaliarmos a relação da massa do tecido renal e peso corporal, é possível observar que os animais submetidos ao procedimento Nx^{5/6} apresentaram aumento dessa relação. Ambos os grupos tratados apresentaram uma redução da relação da massa renal e peso corporal, sendo relevante somente no grupo Nx+MSC (Figura 14).

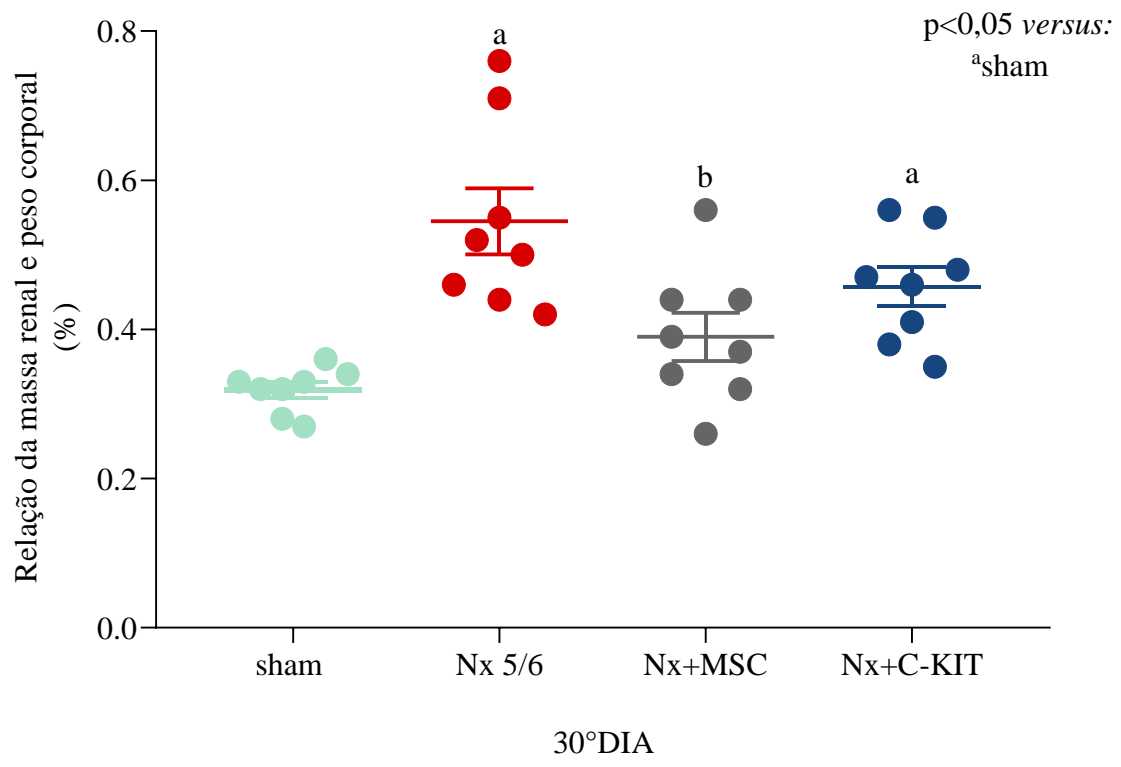


Figura 14 - Relação da Massa renal e peso corporal

4.11 Pressão arterial caudal (PAC)

Como esperado, a PAC dos animais do grupo sham não apresentaram alterações durante o experimento. A média de pressão de todos os grupos no início do experimento foi de $149 \pm 2,6$ mmHg. Após a realização da nefrectomia, todos os animais no 15º dia apresentavam hipertensão. O tratamento com MSC apresentou uma redução da pressão arterial, em níveis sempre abaixo dos animais doentes não tratados de forma significativa (Figura 15).

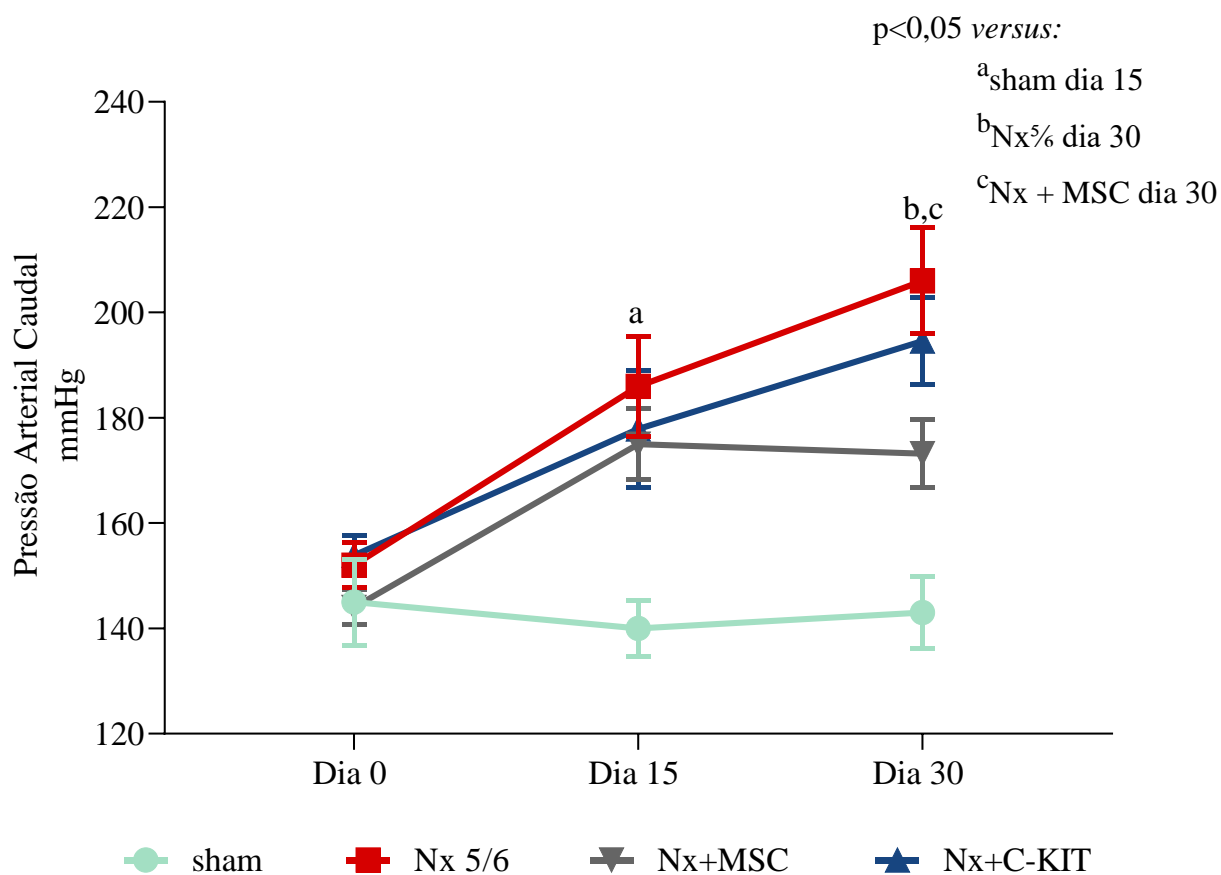


Figura 15 -Curva da PAC dos diferentes grupos, evidenciando aumento da pressão arterial sistólica no 15º dia, em todos os grupos submetidos ao procedimento de Nx^{5/6}. Apenas o tratamento com MSC reduziu a pressão arterial dos animais com DRC.

Visando verificar a porcentagem de redução da pressão arterial no 30º dia, realizamos uma avaliação do delta da pressão arterial, onde ficou evidente que o grupo Nx + C-KIT⁻ apresentou redução de $-11 \pm 10,1\%$ enquanto que no grupo MSC foi de $-32 \pm 12,6\%$ (Figura 16).

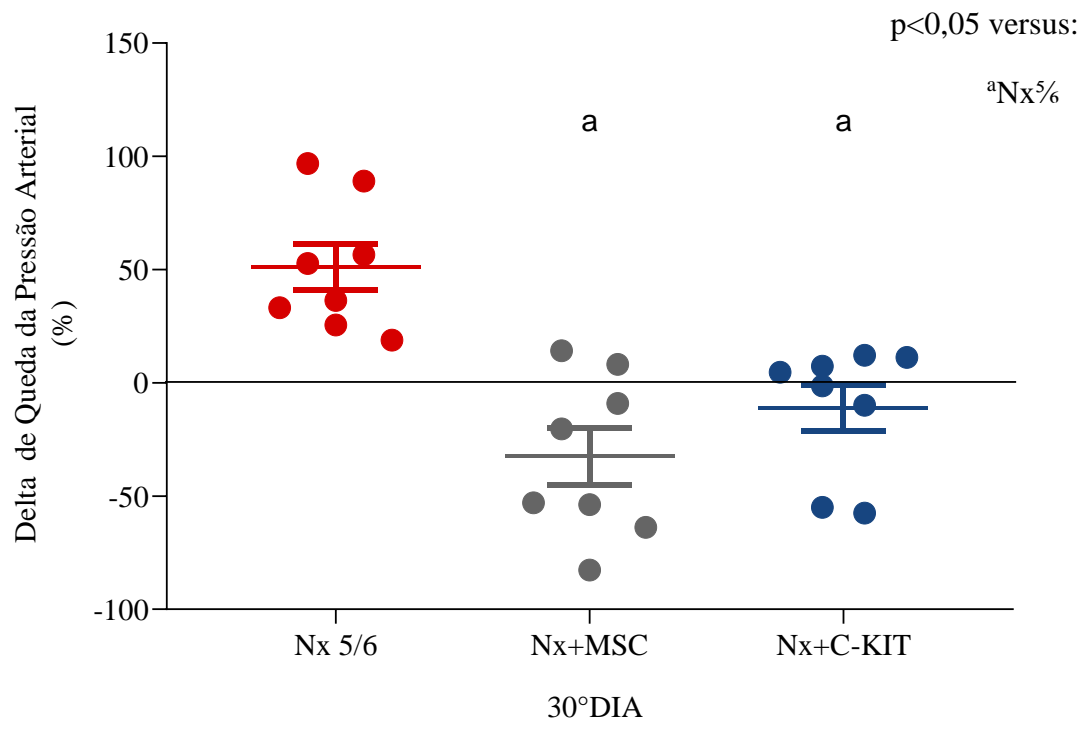


Figura 16 Avaliação do delta de queda da pressão arterial no 30º dia.

4.12 Proteinúria

Ao realizar a dosagem da excreção de proteinúria, observamos que todos os animais submetidos ao procedimento de Nx^{5/6} passaram a apresentar proteinúria severa no 15º dia, e ambos os tratamentos reduziram esta proteinúria de forma significativa no 30º dia (Figura 17).

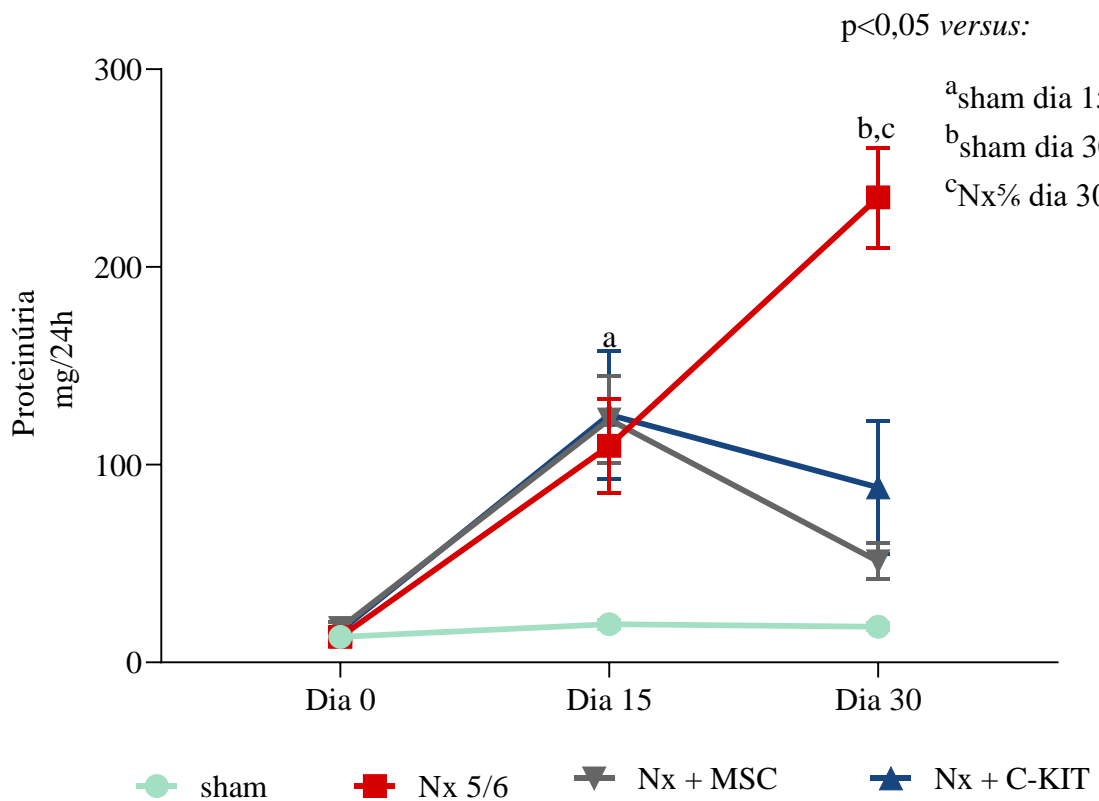


Figura 17 - Curva de proteinúria de 24h nos diferentes grupos nos dias 0, 15 e 30.

4.13 Albuminúria

Ao realizar a dosagem da excreção de albuminúria, observamos que todos os animais submetidos ao procedimento de Nx^{5/6} passaram a apresentar albuminúria severa no 15º dia, e ambos os tratamentos apresentaram redução significativa desse parâmetro no 30º dia (Figura 18).

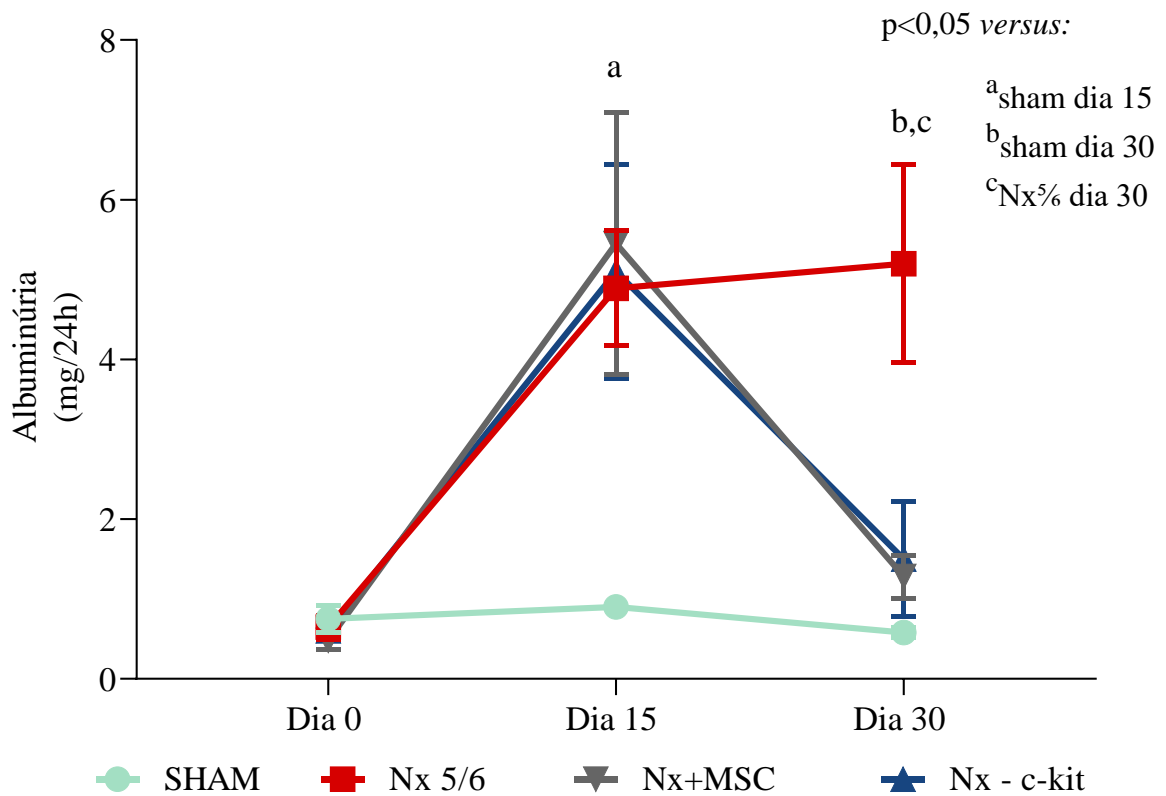


Figura 18 - Curva de excreção de albuminúria de 24h nos diferentes grupos no dia 0, 15 e 30.

4.14 Bioquímica sérica

Todos os animais apresentam níveis séricos de osmolalidade, sódio, potássio, cloro e cálcio. Não apresentando alteração significativa nenhum parâmetro analisado (Tabela 2).

Tabela 2 - Achados séricos nos diferentes grupos.

	Osmolalidade mOsm/H₂O	Sódio (mEq/L)	Potássio (mEq/L)	Cloro (mEq/L)	Cálcio (mg/dL)
sham	271,75 ± 63	144 ± 3	5,7 ± 0,4	70 ± 20	9 ± 0,8
Nx ^{5%}	237,89 ± 45	129 ± 17	5,1 ± 0,8	79 ± 15	10,2 ± 0,2
Nx+MSC	268,65 ± 38	137 ± 3	5,0 ± 0,3	76 ± 20	11 ± 1,3
Nx+C-KIT	310,7 ± 7,2	150 ± 7	5,7 ± 0,3	80 ± 12	12 ± 1,8

4.14.1 Ureia sérica

Todos os animais submetidos à Nx^{5/6} apresentaram aumento significativo dos níveis de ureia sérica, confirmando o estabelecimento da DRC. Houve tendência de diminuição apenas no grupo Nx+ C-KIT (Figura 19).

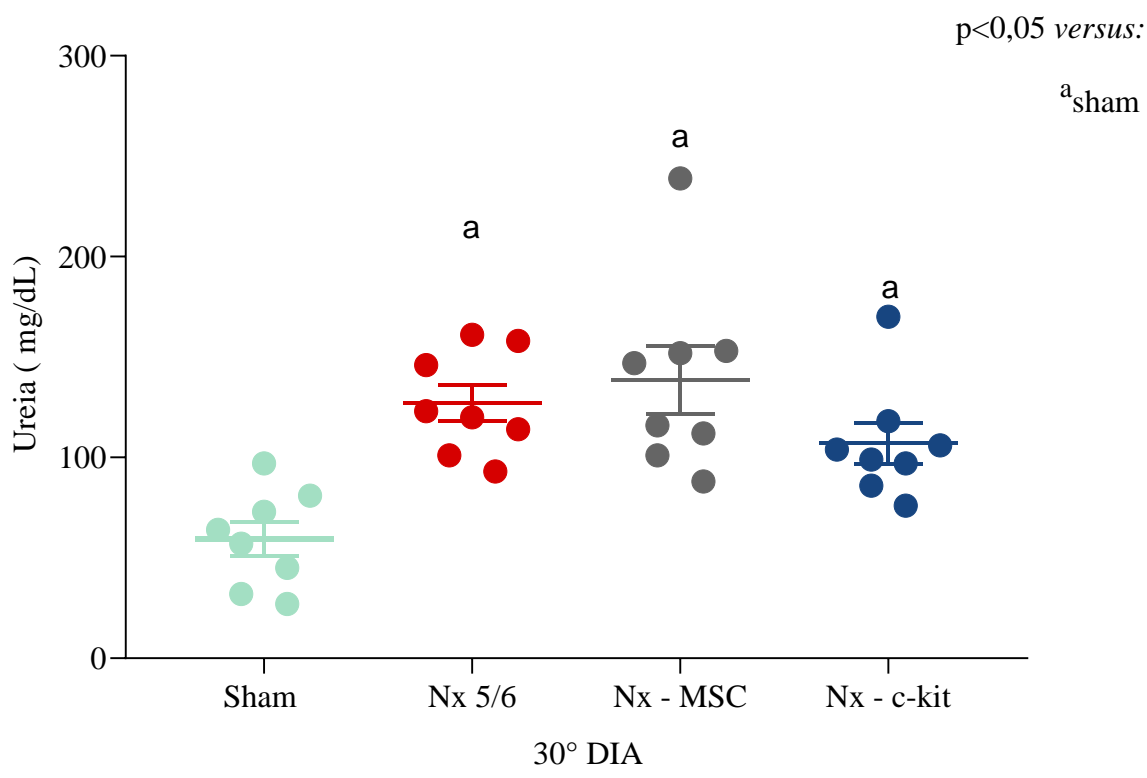


Figura 19 - A avaliação da ureia sérica após 30 dias evidenciou que todos os animais submetidos a procedimento de Nx^{5/6} (^ap<0,05), apresentaram aumento desse biomarcador, quando comparado aos animais do grupo sham. E ambos os tratamentos não alteraram este parâmetro.

4.14. 2 Creatinina sérica

Todos os animais submetidos à Nx^{5/6} apresentaram aumento significativo dos níveis de creatinina sérica. Em ambos os grupos tratados não observamos melhora significativa (Figura 20).

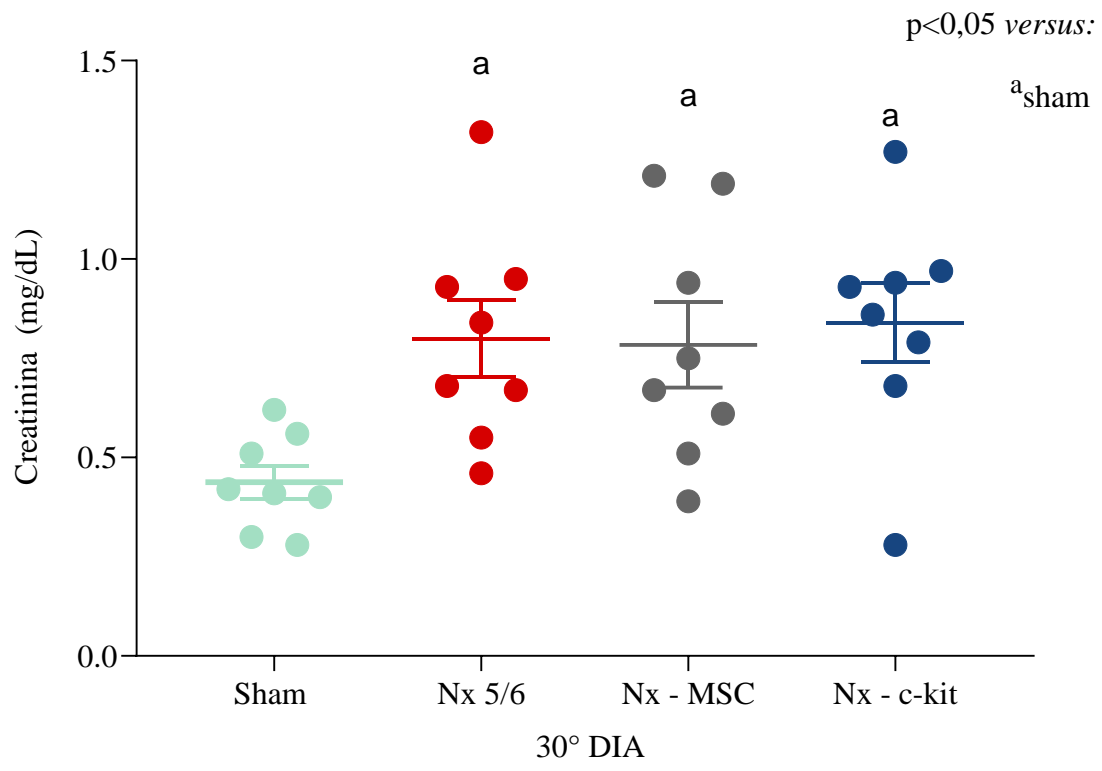


Figura 20 - A avaliação da creatinina sérica após 30 dias evidenciou que todos os animais submetidos a Nx^{5/6} (^ap<0,05) apresentaram aumento desse biomarcador, quando comparado com os animais do grupo sham. E ambos os tratamentos não reduziram esse parâmetro.

4.15 Clearance de Creatinina

Ao realizarmos a análise do clearance de creatinina, evidenciamos que todos os grupos submetidos à Nx^{5/6} apresentaram redução de clearance. Ambos os tratamentos não obtiveram melhora significativa (Figura 21).

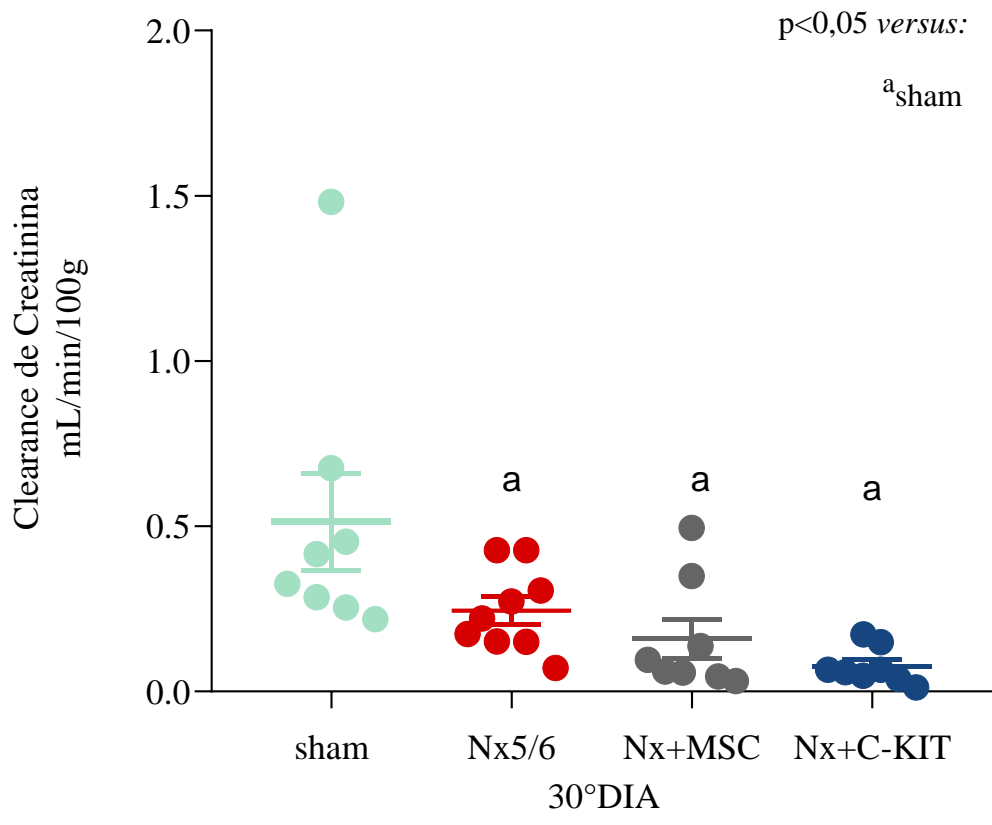


Figura 21 - Avaliação do clearance de creatinina dos diferentes grupos no 30º dia.

4.16 Gaiola metabólica

4.16.1 Consumo de água (mL/24 horas)

Nos dias 0,15 e 30 os animais foram deixados em gaiola metabólica pelo período de 24 horas, neste período foi realizado a aferição do consumo de água em 24 horas pelos animais. O consumo de água foi elevado em todos os animais submetidos ao procedimento de Nx⁵/₆ no 15º dia, esse achado foi mantido em todos no 30º dia e ambos os tratamentos não alteraram o consumo de água em 24 horas (Figura 22).

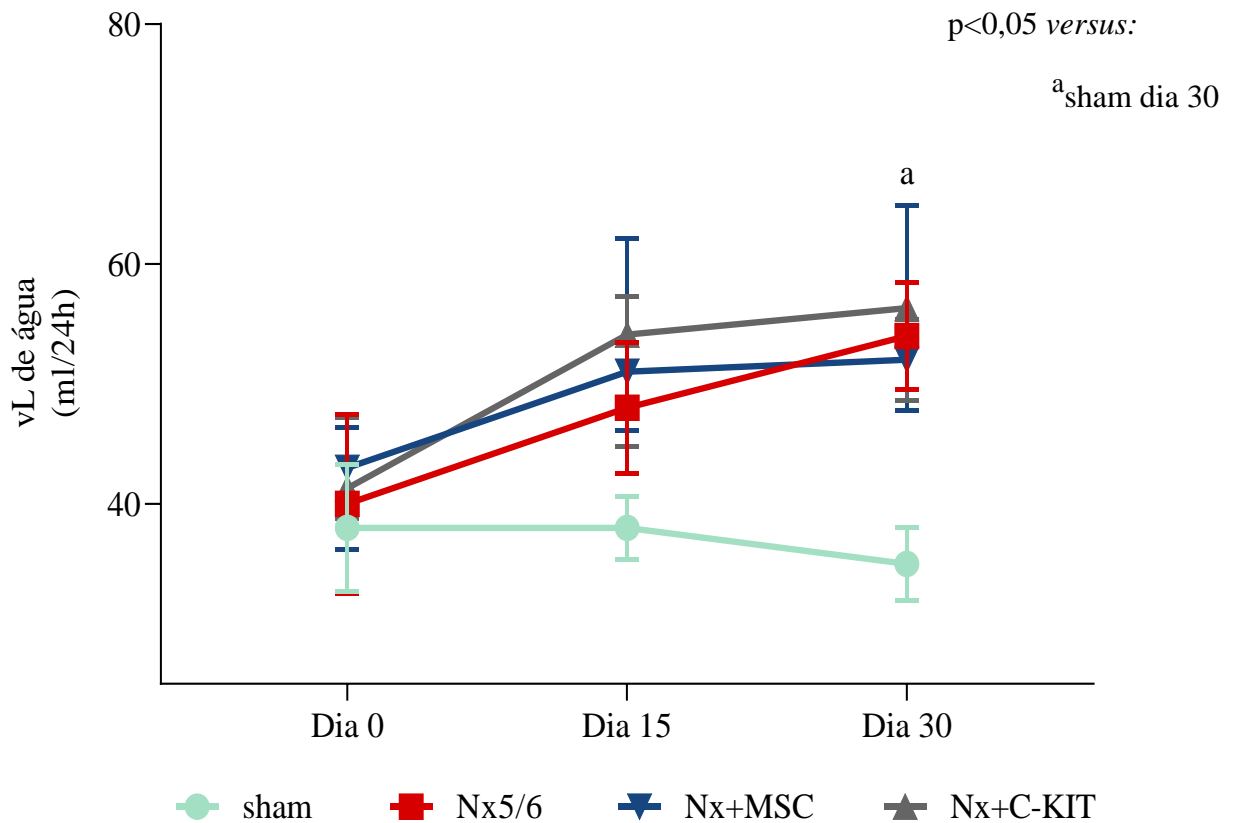


Figura 22 - Curva de consumo de água em 24 horas nos diferentes grupos nos dias 0, 15 e 30 dias de estudo.

4.16.2 Volume urinário

No que se refere a urina produzida em 24 horas, todos os grupos submetidos ao procedimento de Nx^{5%} apresentaram aumento da diurese no 15º dia quando comparado aos animais do grupo sham, esse achado foi mantido no grupo Nx^{5%} e apresentou uma tendência de melhora no grupo Nx+C-KIT (Figura 23).

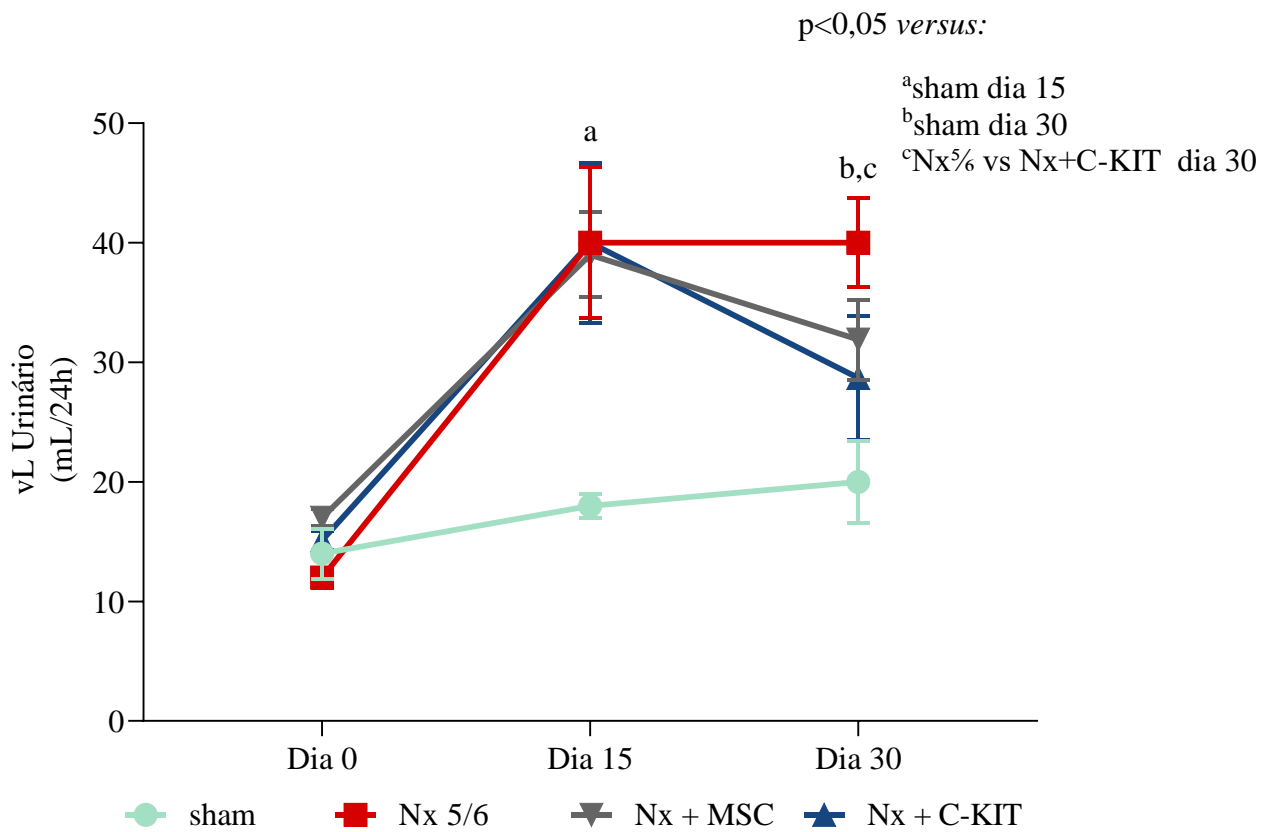


Figura 23 - Curva do volume urinário em 24 horas nos diferentes grupos nos dias 0, 15 e 30 dias de estudo.

4.16.3 Osmolalidade Urinária

A avaliação da osmolalidade urinária no 15º dia mostrou que todos os animais submetidos à Nx5% apresentaram diminuição significativa desta, sendo mantida no 30º dia e com tendência de melhora do parâmetro no grupo Nx + C-KIT e no grupo Nx + MSC (Figura 24).

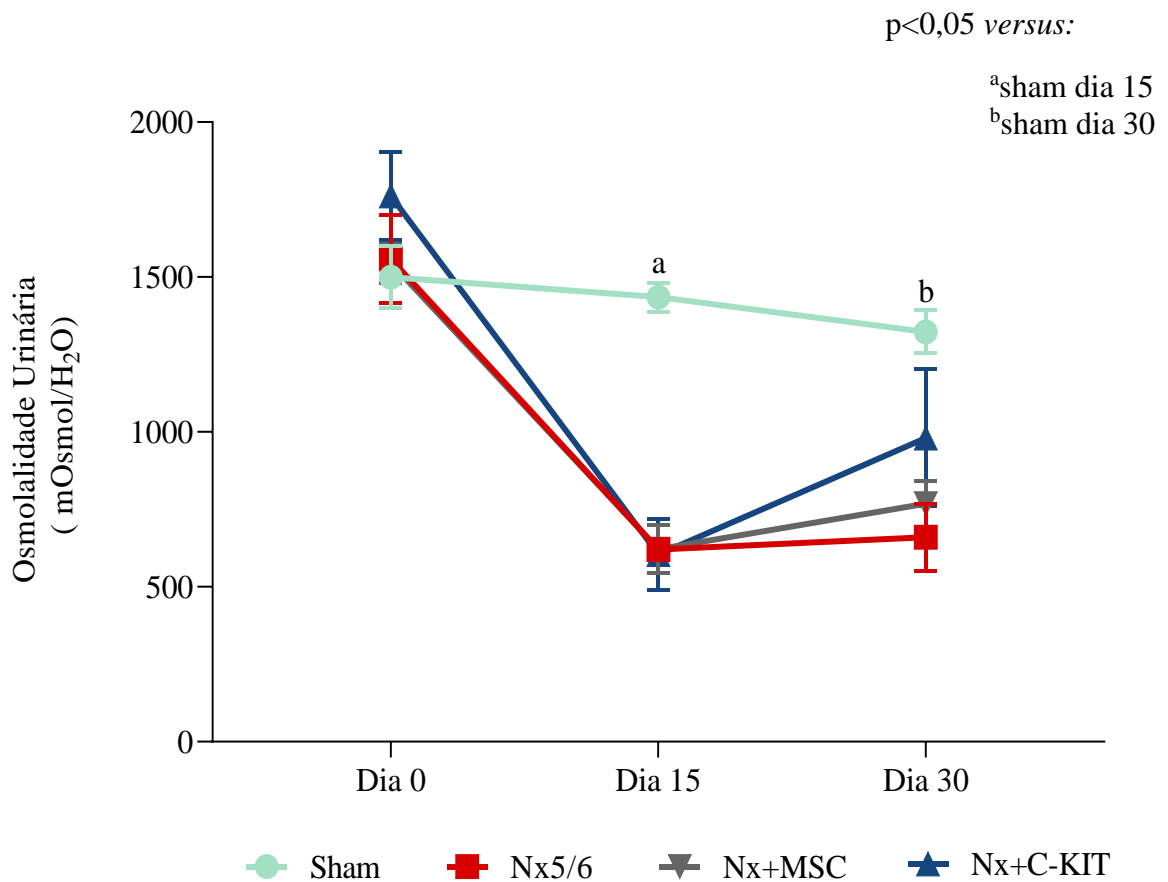


Figura 24 - Curva de osmolalidade urinária em todos os animais submetidos a Nx5% nos dias 0, 15 e 30.

4.16.4 Carga excretada de sódio

A avaliação da porcentagem de carga excretada de sódio no 30º dia apresentou um aumento no grupo Nx^{5/6} e Nx+MSC e uma manutenção dos níveis de excreção de sódio próxima a normalidade no grupo Nx+C-KIT (Figura 25).

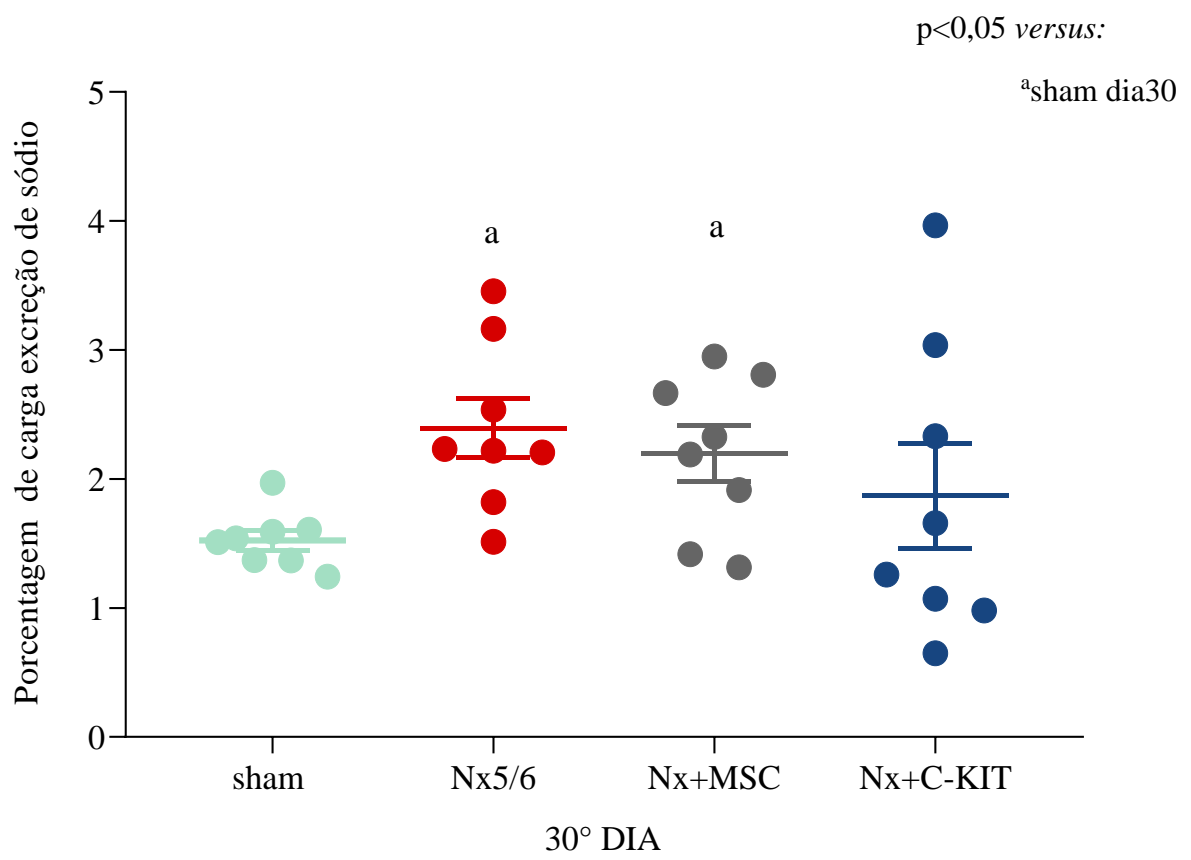


Figura 25 - Carga excretada de sódio no 30º dia nos diferentes grupos.

4.16.5 Carga excretada de potássio

A porcentagem da carga excretada de potássio apresentou aumento significativo no grupo Nx% e em ambos grupos tratados com células MSC e ou C-kit⁺Lin⁻ a carga excretada de potássio retornou aos níveis normais (Figura 26).

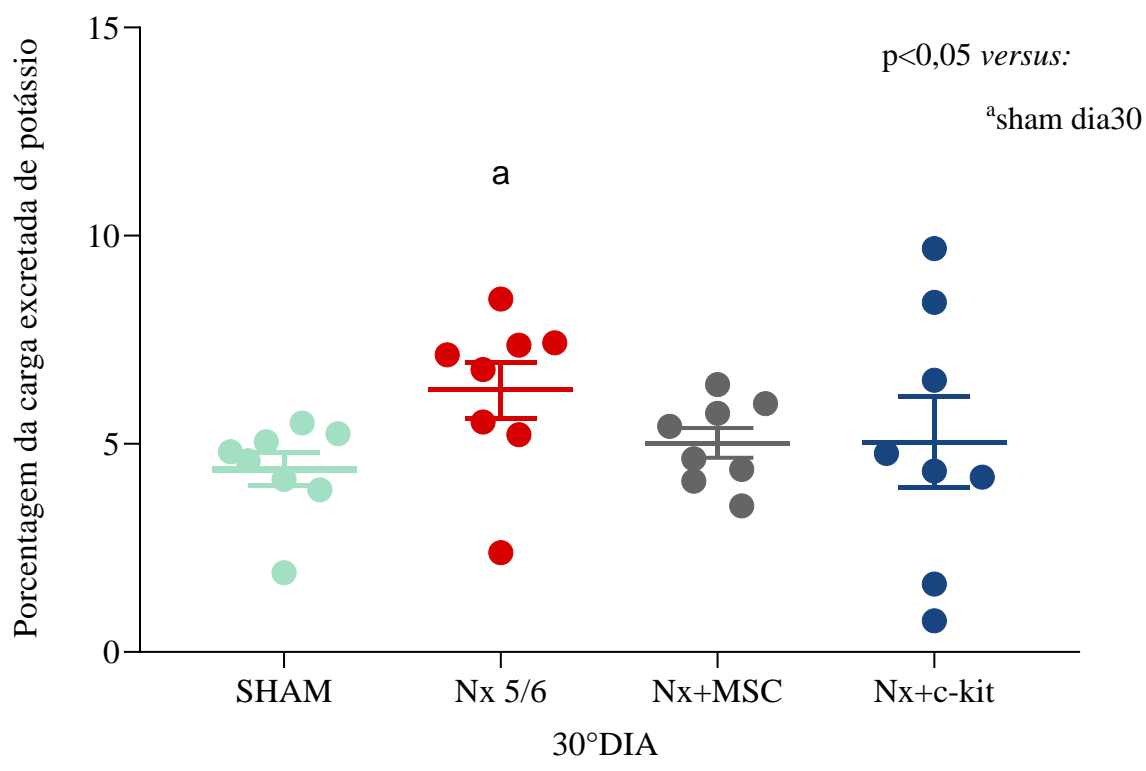


Figura 26 - Carga excretada de potássio no 30º dia nos diferentes grupos.

4.17 Antígeno de Proliferação celular (PCNA)

A expressão do marcador de proliferação celular aumentou significativamente no grupo Nx^{5/6} e no grupo Nx+C-KIT. Embora o grupo Nx+MSC apresente esse aumento, a média de proliferação foi inferior ao grupo Nx+C-KIT (Figura 27).

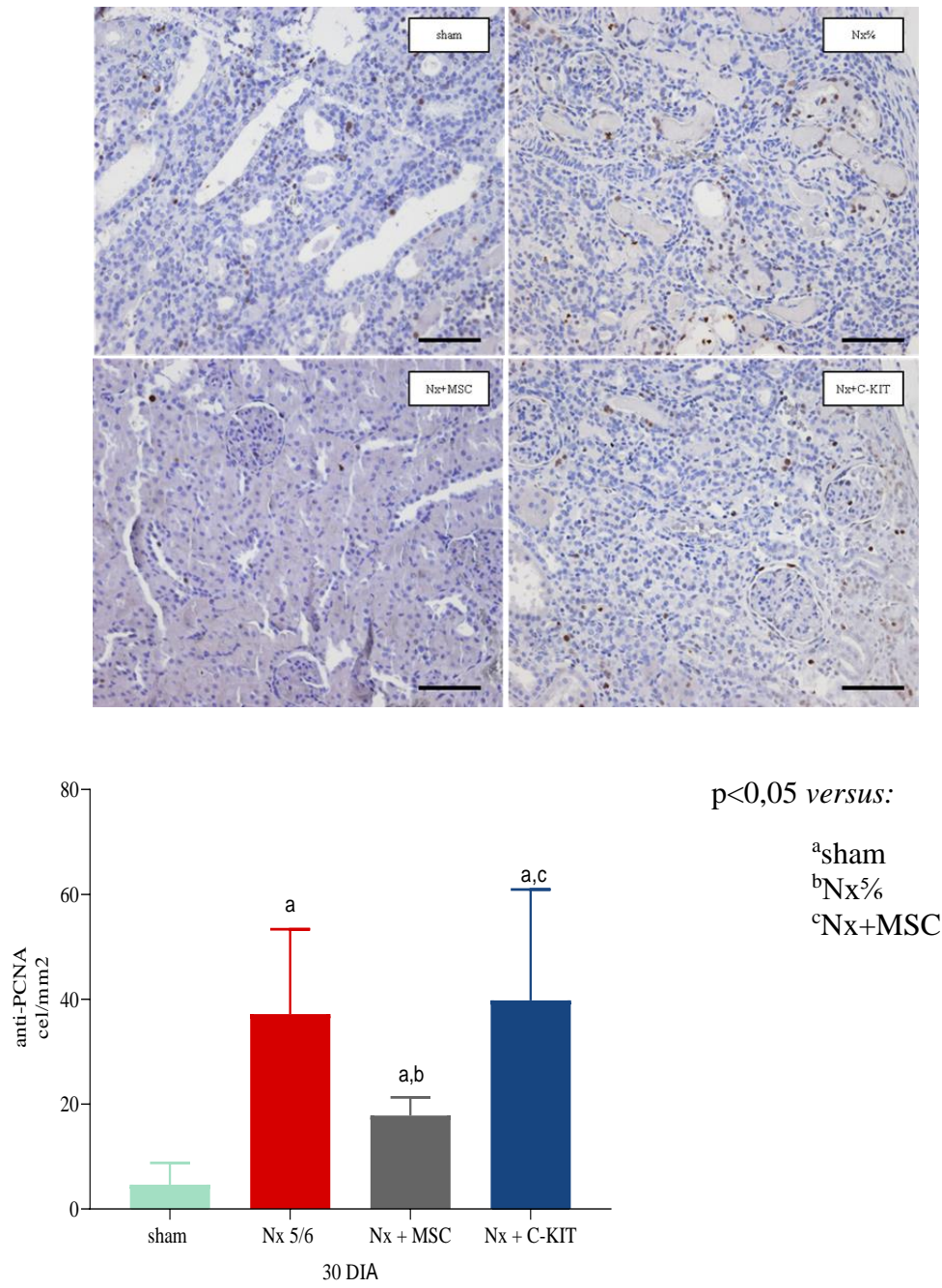


Figura 27 -Determinação (em aumento de 200x) e quantificação da proliferação celular através da detecção do anti-PCNA por imunohistoquímica (em marrom) no córtex renal dos diferentes grupos no 30º dia (200X).

4.18 Expressão de leucócitos Totais no Tecido (CD43)

A expressão do marcador CD43 pan-leucocitário, evidenciou aumento significativo no grupo Nx5% e acentuada redução no grupo Nx+MSC. Quando avaliamos a expressão de CD43 no grupo Nx+CKIT observamos também uma redução na expressão de CD43 quando comparado com o grupo Nx5% porém apresentando níveis maiores que o grupo tratado com MSC (Figura 28).

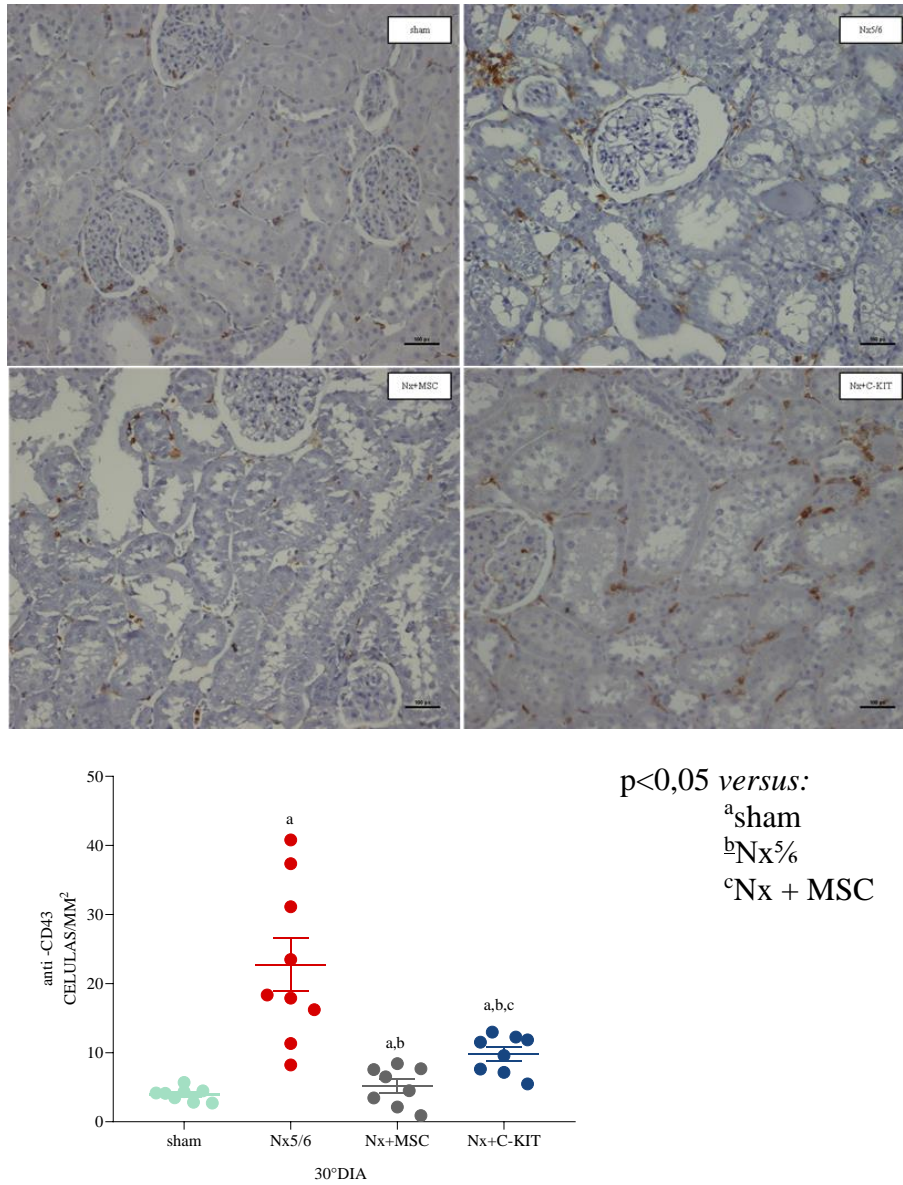


Figura 28 - Determinação e quantificação de leucócitos totais através do marcador anti-CD43 por imunohistoquímica (em marrom) no córtex renal dos diferentes grupos no 30º dia (aumento de 200X).

4.19 Linfócitos (CD3)

Os animais do grupo Nx^{5/6} apresentaram aumento significativo da expressão de CD3, sendo este marcador bastante reduzido no grupo que recebeu MSC. Os animais que foram tratados com CKIT mantiveram a expressão de linfócitos inalterada em relação ao grupo Nx^{5/6} (Figura 29).

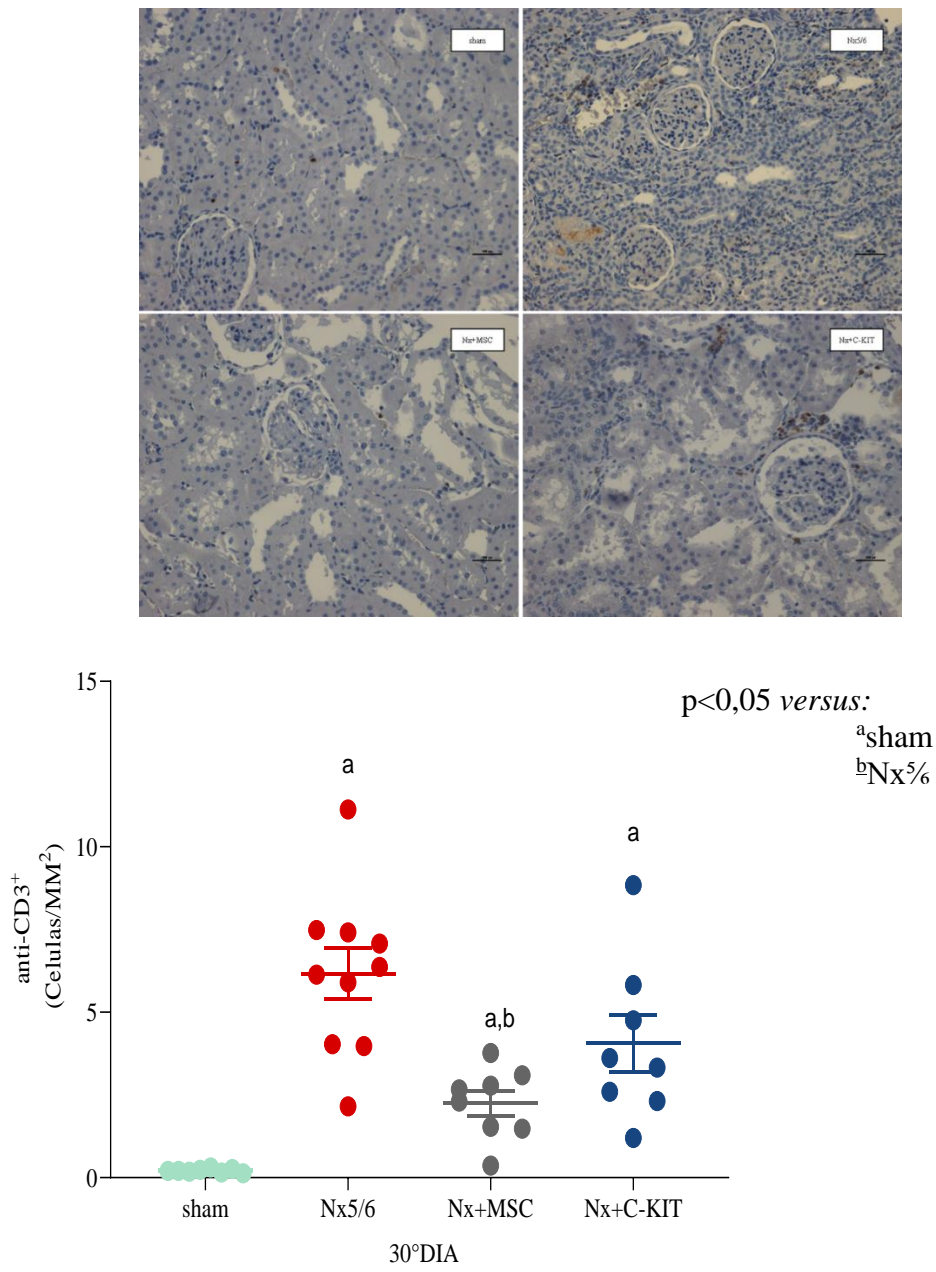


Figura 29 - Determinação e quantificação linfócitos totais através do marcador anti-CD3 por imunohistoquímica (em marrom) (aumento de 200x) no córtex renal dos diferentes grupos no 30° dia.

4.20 Macrófagos (CD206 e CD68)

A expressão total de macrófagos mostrou que os animais do grupo Nx^{5%} apresentaram aumento significativo do infiltrado de macrófagos no tecido renal, enquanto que o grupo Nx+MSC apresentou redução significativa da mesma, conforme figura 30A.

Os achados no grupo Nx+ C-KIT mostraram aumento significativo da expressão total de macrófagos e ao avaliarmos as subpopulações de macrófagos, evidenciamos tanto aumento de M1 (CD68⁺CD206⁻), e M2 (CD68⁺CD206⁺) no tecido renal, conforme figura 31C e 31D. Entretanto o mais importante foi que a relação M1/M2 evidenciou um aumento da população específica M2 (FIGURA 31B e 31E).

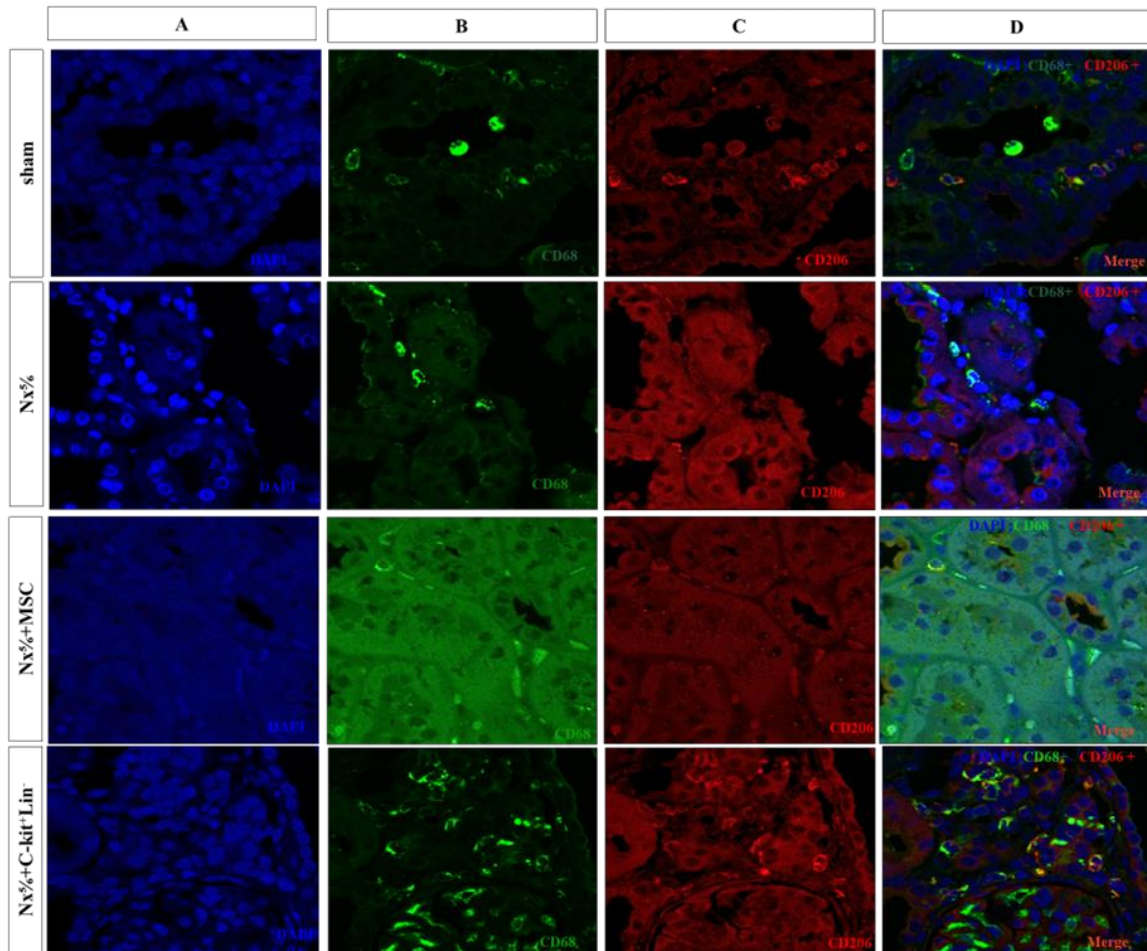


Figura 30 -Imagens representativas da expressão de macrófagos por imunofluorescência nos diferentes grupos, em aumento de 400x. A) Marcação em azul (núcleos pelo DAPI); B) marcação em verde (receptor CD68); C) marcação em vermelho (receptor CD206) e D) merge — indica marcação para M2.

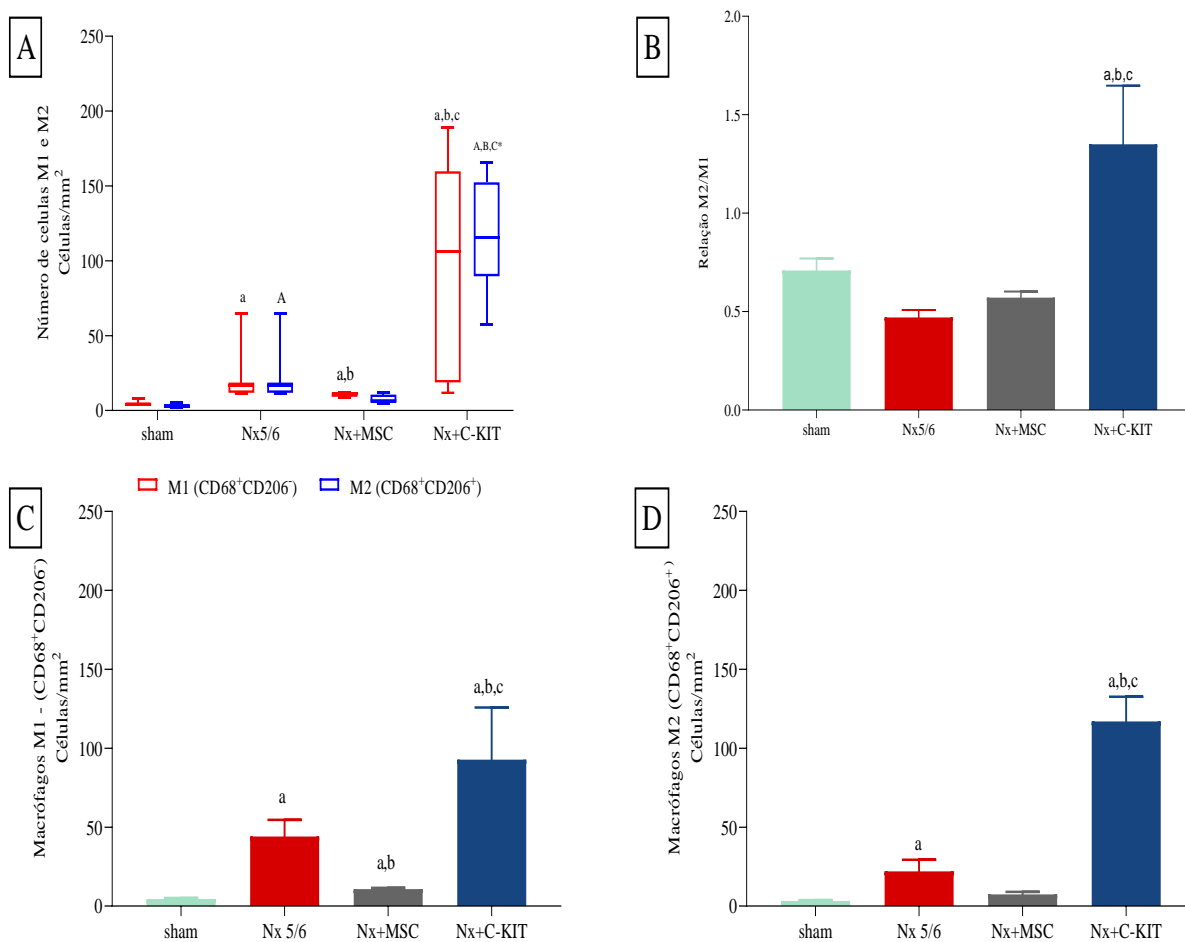


Figura31- Expressão de Macrófagos nos diferentes grupos. A) número total de macrófagos M1(CD68⁺CD206⁻) (em vermelho) (p<0,05 versus- ^asham, ^bNx5%, ^cNx+MSC) e M2 (CD68⁺CD206⁺) (azul) (p<0,05 versus ^Asham, ^BNx5%, ^CNx+MSC) B) relação de macrófagos M2/M1; C) Avaliação da subpopulação de M1 (CD68⁺CD206⁻); e D) M2 (CD68⁺CD206⁺).

4.21 Achados da histopatológicos

Na avaliação histopatológica contamos com a colaboração de patologista experiente em doenças renais. Em relação ao compartimento glomerular, foi realizado inicialmente a contagem de glomérulos totais. Todos os grupos submetidos a Nx^{5/6} independente do tratamento com células apresentou redução importante no número de glomérulos totais.

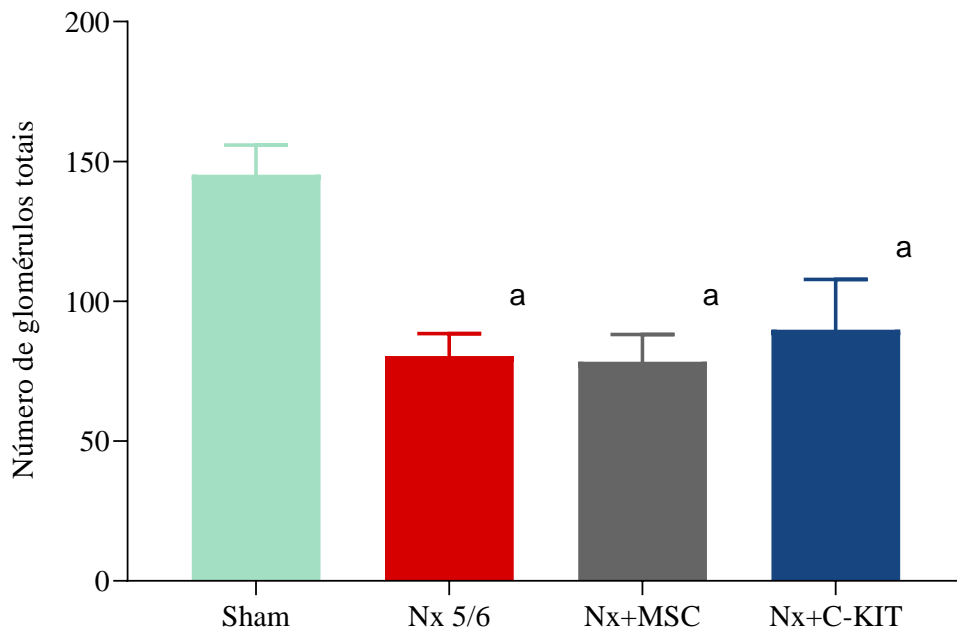


Figura 32 - Quantificação de glomérulos totais em cortes de parafina (3mm²) por HE.

4.21.1 Avaliação da glomeruloesclerose

4.21.1.1 Glomeruloesclerose global

A quantificação da porcentagem de glomeruloesclerose global evidenciou um aumento significativo somente no grupo Nx+C-KIT em comparação com os outros grupos.

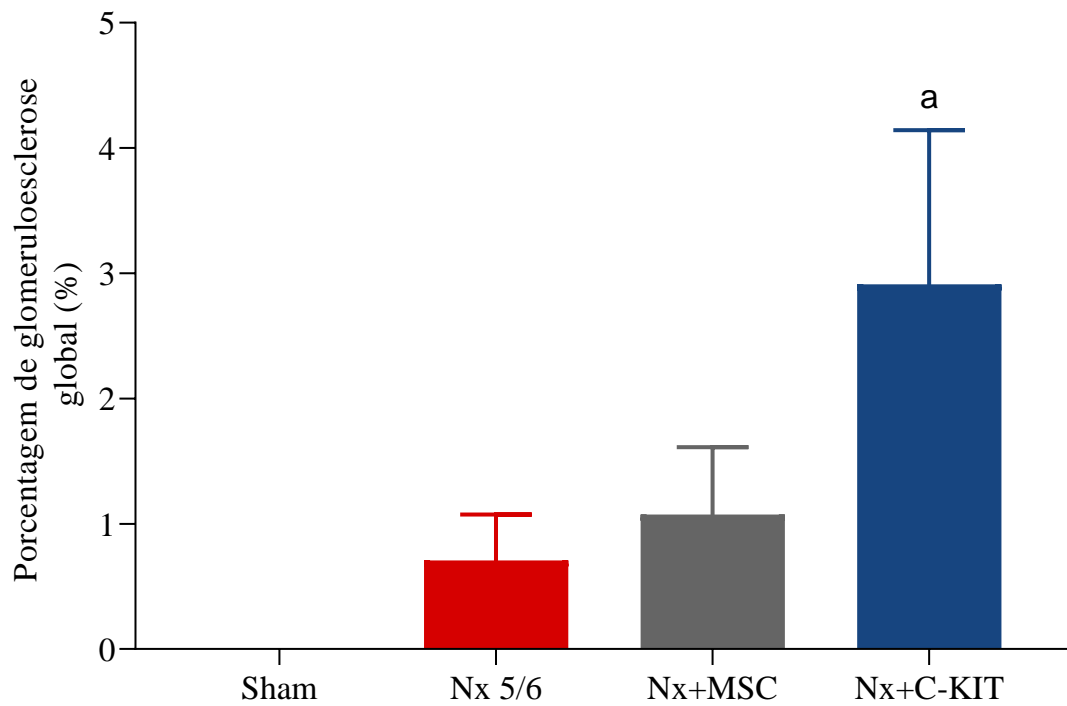


Figura 33 - Porcentagem de glomeruloesclerose global totais em cortes de parafina (3mm²) por HE nos diferentes grupos.

4.21.1.2 Porcentagem de glomeruloesclerose segmentar

Em relação a porcentagem de glomeruloesclerose segmentar, todos os grupos submetidos a Nx $\frac{5}{6}$ foram similares independente do tratamento.

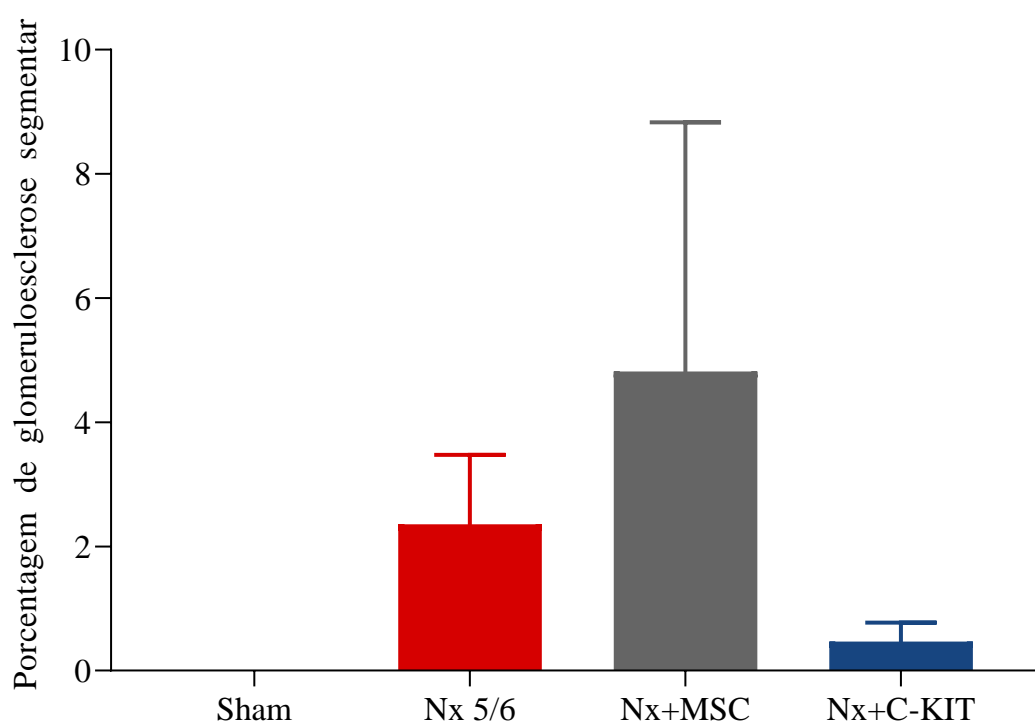


Figura 34 - Porcentagem de glomeruloesclerose segmentar totais em cortes de parafina (3mm²) por HE nos diferentes grupos

4.21.1.3 Fibrose intersticial

Os animais submetidos ao modelo Nx5% evoluíram com comprometimento do túbulo-intersticial no 30º dia, caracterizado por fibrose intersticial. Em ambos os tratamentos, foi apresentado redução significativa da fibrose intersticial, conforme figura 23.

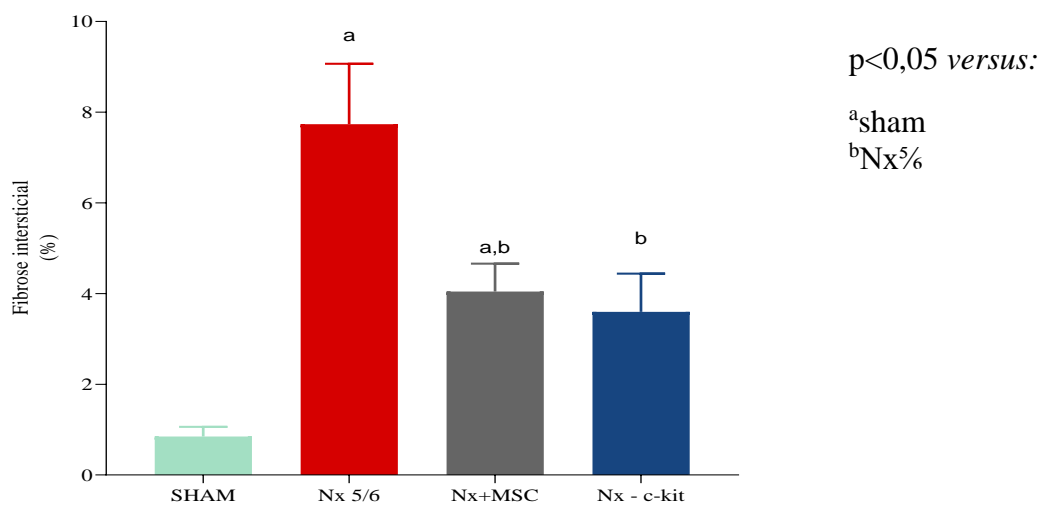
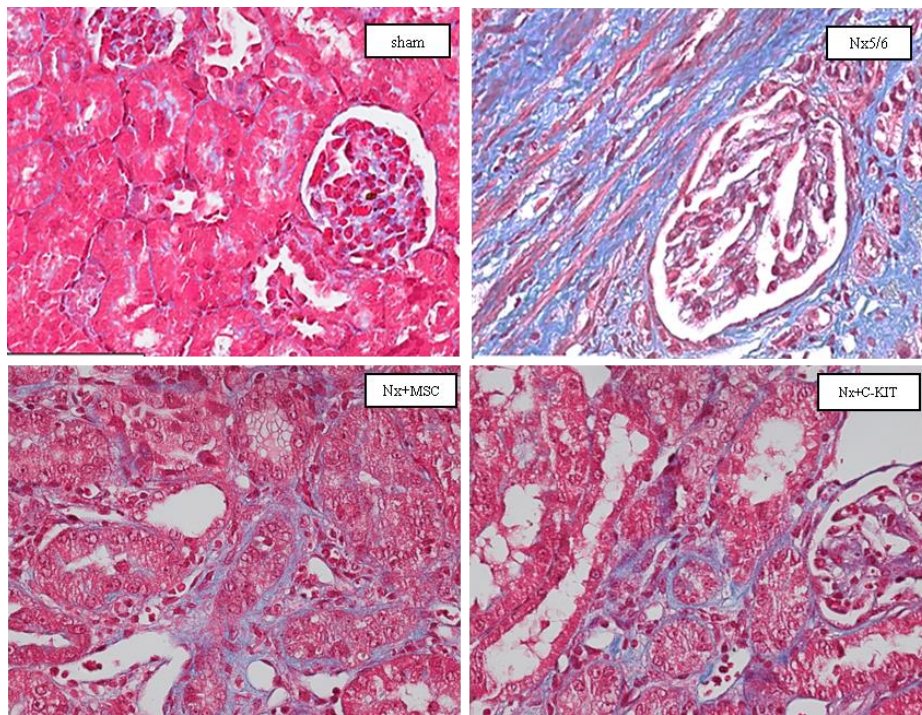


Figura 35 - Determinação e quantificação de fibrose intersticial por meio da coloração de tricrômio de Masson (azul) no córtex renal dos diferentes grupos no 30º dia (aumento de 400x).

5 DISCUSSÃO

A ideia de tratar as doenças crônicas tal como a DRC visa minimizar sintomas clínicos e melhorar a qualidade de vida. Até o momento, pacientes com DRC, a depender do estágio da doença, podem ser tratados para tentar evitar a progressão da doença, com drogas conhecidas como antiproteinúricas, tais como os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) e/ou antagonista do receptor da angiotensina II (BRA). Recentemente, os inibidores da SGLT2 (cotransportadores de sódio e glicose) entraram no cenário mundial como drogas bastante promissoras no controle da DRC, especialmente quando associadas à IECA ou BRA. Por outro lado, pacientes com taxa de filtração glomerular abaixo de 20 ml/minutos ficam praticamente impossibilitados do uso dessas drogas por efeitos adversos. Sendo assim, esses pacientes que não conseguem ser estabilizados acabam evoluindo com perda inexorável da função renal e acabam necessitando de diálise e/ou transplante renal. Infelizmente, nem todos os pacientes têm a chance de realizar o transplante renal, já a diálise, apesar de ter melhorado muito nas últimas décadas em termos de segurança, ainda possui um enorme impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes.

Nesse contexto, a terapia celular surge como uma opção nova a ser testada. Como já mencionado antes, diversos estudos experimentais, pré-clínicos e clínicos já demonstraram vários benefícios do uso das células-tronco mesenquimais para melhora das lesões renais, alterações séricas e urinárias de paciente com DRC (Alexandre et al., 2009; Semedo et al., 2009) Dentre os diversos mecanismos de ação das células mesenquimais, destacam-se: 1) efeito antiproliferativo, 2) anti-apoptótico, 3) anti-fibrótico, 4) imunorregulador e 5) angiogênico – que já foram descritos e bem documentados pela literatura (Alexandre et al., 2009; Semedo et al., 2009) Por outro lado, nosso grupo descreveu, pela primeira vez na literatura, que as células $c\text{-kit}^+\text{Lin}^-$ isoladas do próprio tecido renal também podem exercer ações pró-regenerativas ao tecido renal por mecanismos possivelmente diferentes das MSC. Já demonstramos anteriormente que as células $c\text{-kit}^+\text{Lin}^-$ também têm ações anti-proliferativas e angiogênicas. Sabidamente, as células $c\text{-kit}^+\text{Lin}^-$ apresentam o receptor tirosina quinase, que ao ser ligado por SCF (*stem cell factor*) causa uma fosforilação desse receptor e desencadeia uma sequência de reação que pode levar à ativação das diferentes vias, como proliferação e diferenciação das células (via STATS, Lys, Fyn, PKC, ERK), sobrevivência celular (via mTor, BAD, PKC,

RRK), adesão celular (via PKC), angiogêneses (via NFkB) e motilidade celular (via BAD) (Foster et al., 2018).

Sendo assim, a nossa ideia é justamente testar as células c-kit⁺Lin⁻ no modelo clássico de DRC, Nx⁵%, e compará-las com as MSC na tentativa de entender melhor os mecanismos de ação em termo da regeneração renal. Adicionalmente, queremos comparar as células do próprio tecido renal (c-kit⁺Lin⁻) versus as células mesenquimais extra-renais. Sendo assim, a nossa ideia é justamente testar pela primeira vez a células c-kit⁺Lin⁻ no modelo clássico de DRC.

A escolha do modelo de DRC, Nx⁵%, é justificada por se tratar de um modelo robusto e classicamente conhecido na literatura deste de 1986 (Anderson et al., 1985) É importante salientar que o modelo de Nx⁵% mimetiza a doença renal crônica em humanos, no qual evolui, com alterações hemodinâmicas importantes, a hipertensão arterial, a proteinúria, as alterações tubulares degenerativas e a fibrose renal (Anderson et al., 1985; Webster et al., 2017). Sendo assim, esse modelo se enquadra bastante para testar a hipótese de que as células c-kit⁺Lin⁻ podem representar uma nova opção terapêutica para DRC em estágio inicial, e também em grau mais avançado de evolução.

Em relação aos nossos resultados, ficou claro que os animais nefrectomizados evoluíram com DRC, apresentando hipertensão, proteinúria, poliúria, aumento dos níveis séricos de ureia, creatinina e não apresentam alterações nos níveis séricos de eletrólitos (sódio, potássio e cloro) 15 dias já após a Nx⁵%. Demonstrando assim que o nosso modelo estava funcionando. Como descrito anteriormente nosso estudo apresentou taxa de sobrevivência dos animais após nefrectomia e indução da DRC de 73%, conforme descrito no resultado. Em geral a mortalidade deste modelo descrito pela literatura varia entre 30-40%.

No nosso estudo, após 15 dias da nefrectomia, todos os animais nefrectomizados nitidamente deixaram de ganhar peso em relação ao grupo sham, e o tratamento com células não alterou esse parâmetro. Isso pode ser explicado em parte porque os animais continuam em crescimento, porém, os animais doentes notadamente diferem do grupo sham, conforme descrito na figura 12.

A DRC tem efeito direto sobre o coração, sendo um órgão-alvo importante desta doença. O modelo experimental Nx⁵% tem efeito importante no coração, conforme

descrito Hamzaoui et al., 2020 após desenvolverem DRC os animais passam a apresentar diminuição da função sistólica e diastólica, aumento do peso cardíaco, desenvolvem fibrose coronariana e hipertrofia ventricular cardíaca. Essas alterações, tem a sua fisiopatologia ancorada na hipertensão arterial, nas toxinas urêmicas e processos inflamatórios entre outros fatores (Hamzaoui et al., 2020; Jankowski et al., 2021)

Ao avaliarmos o peso cardíaco em relação ao peso corporal dos animais do grupo Nx^{5%}, estes apresentaram um importante e significativo aumento deste parâmetro em relação ao grupo sham, por provável hipertrofia ventricular cardíaca causada pela hipertensão severa que esses animais desenvolveram.

Notoriamente, o tratamento, tanto com células MSC quanto com c-kit⁺Lin⁻, normalizou esse parâmetro quando comparado ao grupo sham. Em termos de possíveis explicações para esses resultados, somos levados a interpretar que, como os animais que receberam MSC controlaram melhor a pressão, uma possível relação causa e efeito sobre a melhora da hipertrofia cardíaca pode ter acontecido. Por outro lado, o grupo de animais c-kit⁺Lin⁻ induziu uma redução do peso cardíaco para os níveis basais apenas com uma discreta melhora da PAC, o que aponta que essas células agem através de outro mecanismo de ação via tirosina kinase que sem dúvida precisa ser melhor investigada. Estudos anteriores sobre o efeito da remodelação cardíaca indicam que as células c-kit⁺ derivadas do coração têm capacidade regenerativa sobre o miocárdio (Hubbard, 2004), ficando a questão ainda em aberto sobre o papel das células c-kit⁺Lin⁻ de origem renal atuando na musculatura miocárdica.

Já em relação ao peso renal, observamos que no grupo Nx^{5%} houve aumento do peso do rim, como descrito Efstratiadis et al., 2009 esse modelo apresenta expansão mesangial, aumento do volume do órgão, edema e inflamação tecidual. Apenas o tratamento com as células MSC conseguiu reduzir a massa renal por provável efeito anti-fibrótico e anti-inflamatório dessas células. O mesmo não foi observado no grupo tratado com células c-kit⁺Lin⁻ (Anderson et al., 1985; Efstratiadis et al., 2009)

A DRC leva à hipertensão (Askari et al., 2016) e, à medida em que a doença progride, os níveis tensionais podem ir piorando com o tempo, como observado no grupo Nx^{5%} que, já a partir do dia 15 da nefrectomia, começou a apresentar hipertensão e com piora importante ao longo do experimento. Os animais, tratados com células mesenquimais, tiveram redução estaticamente significativa da PAC (em torno de 32%

comparado ao grupo sham), porém, no grupo Nx + C-KIT houve apenas uma melhora discreta conforme demonstrado na figura 15 e 16. Vários estudos já demonstram os efeitos vasoativos e de redução da PAC com o uso da MSC, portanto, esse resultado era esperado (Eirin et al., 2017; Kliem et al., 1996; Noronha et al., 2011).

Na sequência, nós analisamos a presença da proteinúria e albuminúria. A proteinúria, e mais especificamente a albuminúria, é um marco da progressão da doença renal crônica e ela expressa lesões oriundas da barreira de filtração glomerular e da perda de podócitos. No presente estudo, ambos os grupos de animais tratados com c-kit⁺Lin⁻ e MSC tiveram melhora significativa da proteinúria ao redor de 60%. Talvez o controle da proteinúria pelas MSC foi devido ao controle pressórico, entretanto, para explicar a melhora da proteinúria no grupo Nx + C-KIT, uma possibilidade poderia ser os efeitos sobre o citoesqueleto podocitário. Descrevemos anteriormente que as células c-kit⁺Lin⁻ atuam a favor da regeneração do citoesqueleto em modelo nefropatia por puromicina (Rangel et al., 2018), entretanto, não se pode excluir outras vias de reparo do tecido renal como, por exemplo, o bloqueio do sistema renina, angiotensina-aldosterona e a via mTor – que precisam ser analisados.

A avaliação do clearance de creatinina estima a taxa de filtração glomerular, mostrando que todos os animais Nx⁵% tiveram uma perda do clearance, conforme figura 15. No entanto, os animais que receberam células MSC apresentaram uma tendência de melhora do clearance. Essa relação poderia estar associada ao efeito anti-inflamatório do tecido renal pela melhora da pressão arterial (Abumoawad et al., 2020; Campese et al., 1995)

No que se refere ao volume urinário, é de conhecimento da literatura que o modelo de Nx⁵% causa alterações nos túbulos renais, como a perda da borda em escova do epitélio proximal, alterações na luz dos túbulos renais, atrofia tubular e fibrose intersticial. Essas alterações levam ao aumento do volume urinário e, conseqüentemente, à perda da capacidade de concentração urinária, além da perda dos ajustes finos de eletrólitos (Anderson et al., 1985; Kliem et al., 1996).

Nossos resultados demonstraram que todos os animais nefrectomizados ingeriram mais água do que os animais sham e o tratamento com células não alteraram este dado. Mais ainda, todos os animais submetidos à nefrectomia desenvolveram poliúria importante já a partir do 15º dia, indicando que a doença e as alterações túbulo-intersticial

já estavam instaladas. Chamou a atenção que após o tratamento com ambas as células, houve uma queda do volume urinário significativamente, apenas no tratamento com células c-kit+Lin- o que pode apontar para um mecanismo de reparo do epitélio tubular uma vez que C-KIT é um progenitor específico de células tubulares renais. Entretanto, mais experimentos que visem os marcadores tubulares de manejo de água e sódio faz se necessário para esta confirmação.

Ao analisar a osmolalidade urinária, observamos que os animais submetidos à nefrectomia apresentaram, no 15º, dia uma diminuição significativa das partículas osmoticamente ativas quando comparada aos animais do grupo sham. Após o tratamento com ambas as células, houve uma tendência de melhora desse parâmetro, podendo ser relacionada à melhora no grupo tratado com c-kit+Lin- pela possível diferenciação epitelial, e no tratamento com a MSC pela preservação do epitélio, conforme figura 24.

Na avaliação da carga de excreção de sódio notamos que os animais do grupo Nx5% e os tratados com MSC aumentaram a carga de excreção sódio enquanto que os tratados com células C-KIT mantiveram a carga excretada de sódio em níveis próximos aos normais, sugerindo mais uma vez que a ação das células C-KIT por algum mecanismo ainda não revelado contribuiu para o reparo celular tubular, conforme figura 25. Já as análises da carga excretada de potássio observamos um aumento em todos os animais que desenvolveram DRC e ambos os tratamentos mantiveram os níveis da carga de excreção do potássio em níveis normais. Nossos dados abrem um espaço para futuras investigações a procura de mecanismos e vias de reparo celular renal.

O modelo de Nx5% causa no tecido renal lesões hemodinâmicas, inflamatórias, de estresse oxidativo dentre outras (Campese et al., 1995). Portanto, para entender melhor os mecanismos celulares de reparo tecidual com o uso de terapia celular nos animais com DRC, escolhemos ainda a análise do antígeno de proliferação celular (PCNA), por ser um marcador específico da duplicação do DNA e isto implicaria em proliferação celular para reparo tecidual renal. Fortes evidências apontam que a regeneração renal se baseia apenas na proliferação intratubular renal das células sobreviventes a uma lesão prévia. A regeneração do epitélio tubular renal tem sido um motivo de intenso debate gerando múltiplas hipóteses. Estudos em animais transgênicos envolvendo localização e migração celular sugere que as células do epitélio tubular renal é a fonte para seu próprio reparo (Humphreys et al., 2011; Lin et al., 2005). Um estudo envolvendo pulsos de nucleotídeos análogos após modelo murino de isquemia reperfusão sugere ausência de células-tronco específica no rim (Humphreys et al., 2008, 2011), entretanto a identidade das populações

de progenitores renais em estruturas já diferenciadas, como túbulos e glomérulos, é menos conhecida. Todos estes estudos geraram uma controvérsia entre os pesquisadores, e desafiaram o significado de estudos de vários outros grupos que investigam a existência e a importância de células-tronco renais no período pós-natal. Entretanto apesar de controverso os mesmos pesquisadores que não acreditam em células tronco renais específicas no período pós-natal, até o momento, não apresentaram provas conclusivas para excluir esta possibilidade. Estudos em outros órgãos tem gerado a mesma controvérsia. Nosso grupo demonstrou pela primeira vez a existência de um progenitor renal tecido específico (C-KIT) que perdura na vida adulta e que poderia participar deste processo de proliferação e regeneração do tecido renal após insulto agudo ou crônico.

Neste nosso estudo atual, observamos na figura 27 que os animais do grupo Nx^{5%} apresentaram uma intensa marcação para PCNA em contraste com o grupo tratado com MSC que praticamente inibe bastante, mas não totalmente a resposta de proliferação tecidual. Notadamente, nos animais que desenvolveram DRC ao receber tratamento com as células C-KIT praticamente não demonstraram mudança na quantificação da proliferação celular o que pode sugerir: a) as células C-KIT não interferem com o mecanismo de proliferação celular b) estas células que estão proliferando podem ser células inflamatórias uma vez que as células MSC fizeram uma inibição forte mas não total da marcação do PCNA c) as células proliferando poderiam ser células C-KIT tecido específicas ou um *mix* de células que proliferam para manter homeostase. Uma vez que só fizemos apenas marcação simples para PCNA não podemos especificar com exatidão quais as células que estão proliferando e isto é uma limitação do estudo.

Caminhando ainda na direção para analisar a resposta inflamatória ao modelo de DRC experimental, avaliamos o marcador CD43 que é um receptor que se apresenta em comum a todas as células leucocitárias, sendo esta molécula responsável pela adesão celular (Ostberg et al., 1998). Como esperado, os animais submetidos a Nx^{5%} evidenciaram aumento da expressão de CD43 e o tratamento com células Nx+MSC apresentou redução acentuada deste marcador, de acordo com dados já conhecido na literatura.(Qian et al., 2021). Entretanto, trazemos um dado novo que é a redução da expressão de CD43 no grupo Nx+C-KIT em menor proporção do que ocorreu no grupo Nx+MSC, conforme figura 28.

Adicionalmente, avaliamos a expressão de outras células inflamatórias específicas da resposta imune celular como: linfócitos T total (CD3) e macrófagos (CD68 E CD206),

figura 29 e 30 e 31. Nossos resultados evidenciaram que o grupo Nx^{5%} apresentou aumento da expressão de linfócitos T e o grupo tratado com células Nx+MSC apresentou redução acentuada e significativa do mesmo, entretanto, o grupo Nx+C-KIT não alterou a resposta local em relação a ativação dos linfócitos o que nos intriga, uma vez que a expressão de CD43 foi ligeiramente suprimida pela a ação das células c-kit⁺Lin⁻. A pergunta seguinte é: que células do sistema imune que foi ativada pelo tratamento com as células c-kit⁺Lin⁻ que expressão CD43, mas não expressam CD3? Até o momento podemos afirmar que nossos resultados trouxeram à luz uma nova discussão a respeito do papel do receptor tirosina quinase na modulação da inflamação o que comprova uma diferença de ação destas células quando comparadas com as células MSC. Para tentar responder quais células poderiam estar sendo ativadas no grupo que recebeu células c-kit⁺Lin⁻ verificamos também a presença de macrófagos.

Os macrófagos são células leucocitárias que podem apresentar vários mecanismos de ação, sendo a subpopulação M1 pró-inflamatória (CD68⁺CD206⁻), e a M2 (CD68⁺CD206⁺), anti-inflamatória (Cho et al., 2022). Quando avaliamos as expressões no tecido renal, os animais do grupo Nx^{5%} apresentaram aumento global e significativo das populações de M1 e M2, denotando um processo inflamatório intenso esperado em uma doença renal crônica e provavelmente a população de M2 aumenta para poder modular a resposta em relação a M1. Claramente, somente o tratamento com células MSC diminuíram a expressão dos macrófagos a níveis normais e semelhante ao grupo sham. Em contrapartida, ao avaliarmos os animais do grupo tratado com células c-kit⁺Lin⁻, esses apresentaram um aumento muito significativo de mais que 1,5x de marcação em relação aos os animais com DRC, tanto na expressão de M1 quanto M2. Especificamente, é importante ressaltar que a quantidade de marcação para M2 exibiu um aumento maior nos animais tratados com células c-kit⁺Lin⁻ revelando que estas células também agem de forma anti-inflamatória modulando a resposta inata. As vias de ativações dos macrófagos são diversas, variando conforme a resposta da subpopulação. A ativação dos macrófagos e dependentes de fatores externos, na subpopulação de M1 tem como sua ativação por intermédio do Interferon-Gama (IFN- γ), Lipopolissacarídeos (LPS) ou Fator de Necrose tumoral (TNF).(Lammie et al., 1994). A ativação dos receptores de membrana, no caso do M1, causará uma cascata de eventos, intermediada pelas proteínas Janus Quinase (JAK) 1 e 2 e Transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) 1 que pode transferir ao núcleo do macrófago a necessidade de expressar ou produzir citocinas pró-inflamatórias (Alphonse et al., 2022; Lammie et al., 1994). Já na subpopulação de M2

tem como sua ativação por intermédio de Interleucina 4,13 e 10 (IL-4, 13 e 10) e por intermédio de receptor do tipo Toll () Ficou evidente que neste experimento ambas as células podem modular a resposta inflamatória através de vias de sinalização diferentes possivelmente contribuindo para a melhora da inflamação tecidual e por conseguinte reparo tecidual.

Dando sequência a nossa investigação, analisamos a histologia renal para termos o componente anatômico e morfofuncional da DRC experimental. O modelo de Nx^{5%} causa alterações hemodinâmicas renais importantes, com a necessidade de adaptações celulares para manter as mesmas funções. Com isto ocorre aumento da pressão glomerular, aumento do fluxo plasmático renal e do tufo glomerular. Esse aumento do tufo glomerular faz com que exista uma necessidade dos podócitos estenderem seus pedicelos para cobrir maiores extensões do capilar glomerular, e como consequência desta adaptação, ocorre uma perda podocitária (Lenihan et al., 2016; Rószler, 2015) o que leva a uma lacuna na barreira de filtração glomerular e o início de proteinúria. Esta lesão acaba por liberar citocinas e fatores inflamatórios que desencadeiam a migração células imunológicas tais como os fibroblastos para esta região. A presença e ativação dos fibroblastos acaba por produzir depósito de matriz extracelular (colágeno) na lacuna deixada pelos podócitos, e como consequência ocorre cada vez mais um acentuado aumento de matriz extracelular causando a uma disfunção do glomérulo (Lenihan et al., 2016). Esta lesão glomerular, por conseguinte, apresenta efeito secundário e em cascata que é a diminuição do fluxo plasmático nos capilares peritubulares, decorrente da alteração do tufo glomerular, e a presença de proteinúria. Tudo isto, acaba tendo efeito direto sobre as células dos túbulos, causando hipoxia, inflamação e estresse oxidativo. Como consequência final deste processo em cadeia temos a presença de miofibroblastos produzindo matriz extracelular. As interações diretas entre as células tubulares lesionadas e os miofibroblastos também pioram a perda da função, e de forma progressiva culmina com a fibrose e perda definitiva da função renal.

No presente estudo nos demonstramos que no 15º dia todos os animais submetidos ao procedimento de Nx^{5%} já apresentavam um pequeno a moderado grau de fibrose intersticial, e esse valor aumentou progressivamente com o tempo, e ambos os tratamentos, tiveram efeitos na redução da fibrose intersticial. Muito provavelmente a melhora da fibrose no grupo Nx+MSC ocorreu devido a supressão das células leucocitárias dos linfócitos e dos macrófagos. Enquanto isto observamos inicialmente que

o tratamento do grupo Nx+C-KIT apresentou efeito na melhora da fibrose mesmo sem a redução significativa nos marcadores de leucócitos e linfócitos, porém houve um aumento importante dos macrófagos M2 sugerindo assim uma outra via de ação no controle da fibrose. Esse achado nos mostra ainda, a necessidade de melhor entender o mecanismo de ação das células C-kit⁺Lin⁻ da fibrose intersticial.

No que se refere a quantidade de glomérulo no tecido renal, e possível visualizar que todos os animais submetidos ao procedimento de Nx^{5/6} apresentaram diminuição do número de glomérulos, este evento está associado com a expansão mesangial e a necessidade de manter a homeostasia. Além disso, houve aumento da glomerulosclerose global e segmentar em todos os animais submetidos ao procedimento de Nx^{5/6} e ambos os tratamentos não mostraram melhora deste parâmetro. Esses achados evidenciam que após o estabelecimento da glomerulosclerose global ou segmentar e fibrose intersticial não é mais possível reverter o quadro, entretanto podemos agir para tentar parar este processo fibrótico, através de mais estudos que explorem suas vias de sinalização.

Finalmente, podemos concluir que o nosso estudo trouxe o conceito e a primeira comprovação de que progenitores renais tecido específico como as células c-kit⁺Lin⁻ podem ser usadas como uma nova opção terapêutica para diminuição da progressão da doença renal crônica experimental. Futuros experimentos e estudos pré-clínicos usando as células c-kit⁺Lin⁻ são necessários para explorar e entender melhor os mecanismos de ação dessas células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbud Filho, M., & Lopes, J. C. C. (2017). The cost of renal replacement therapy in Brazil and the story of the short blanket. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 39(2). <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20170026>
- Abumoawad, A., Saad, A., Ferguson, C. M., Eirin, A., Herrmann, S. M., Hickson, L. J., Goksu, B. B., Bendel, E., Misra, S., Glockner, J., Dietz, A. B., Lerman, L. O., & Textor, S. C. (2020). In a Phase 1a escalating clinical trial, autologous mesenchymal stem cell infusion for renovascular disease increases blood flow and the glomerular filtration rate while reducing inflammatory biomarkers and blood pressure. *Kidney International*, 97(4), 793–804. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.11.022>
- Alexandre, C. S., Volpini, R. A., Shimizu, M. H., Sanches, T. R., Semedo, P., di Jura, V. L., Câmara, N. O., Seguro, A. C., & Andrade, L. (2009). Lineage-Negative Bone Marrow Cells Protect Against Chronic Renal Failure. *Stem Cells*, 27(3), 682–692. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0496>
- Alphonse, N., Wanford, J. J., Voak, A. A., Gay, J., Venkhaya, S., Burroughs, O., Mathew, S., Lee, T., Evans, S. L., Zhao, W., Frowde, K., Alrehaili, A., Dickenson, R. E., Munk, M., Panina, S., Mahmood, I. F., Llorian, M., Stanifer, M. L., Boulant, S., ... Odendall, C. (2022). A family of conserved bacterial virulence factors dampens interferon responses by blocking calcium signaling. *Cell*, 185(13), 2354-2369.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.028>
- Anderson, S., Meyer, T. W., Rennke, H. G., & Brenner, B. M. (1985). Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *Journal of Clinical Investigation*, 76(2), 612–619. <https://doi.org/10.1172/JCI112013>
- Askari, H., Seifi, B., & Kadkhodae, M. (2016). Evaluation of Renal-Hepatic Functional Indices and Blood Pressure Based on the Progress of Time in a Rat Model of Chronic Kidney Disease. *Nephro-Urology Monthly*, 8(3). <https://doi.org/10.5812/numonthly.37840>
- Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., &

- Anversa, P. (2003). Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell*, *114*(6), 763–776. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00687-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00687-1)
- Biancone, L., & Camussi, G. (2014). Potential use of stem or progenitor cells for kidney regeneration. *Nature Reviews Nephrology*, *10*(2), 67–68. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.257>
- Campese, V. M., Kogosov, E., & Koss, M. (1995). Renal afferent denervation prevents the progression of renal disease in the renal ablation model of chronic renal failure in the rat. *American Journal of Kidney Diseases*, *26*(5), 861–865. [https://doi.org/10.1016/0272-6386\(95\)90456-5](https://doi.org/10.1016/0272-6386(95)90456-5)
- Cavaglieri, R. C., Martini, D., Sogayar, M. C., & Noronha, I. L. (2009). Mesenchymal Stem Cells Delivered at the Subcapsule of the Kidney Ameliorate Renal Disease in the Rat Remnant Kidney Model. *Transplantation Proceedings*, *41*(3), 947–951. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.01.072>
- Cho, H., Kwon, H.-Y., Sharma, A., Lee, S. H., Liu, X., Miyamoto, N., Kim, J.-J., Im, S.-H., Kang, N.-Y., & Chang, Y.-T. (2022). Visualizing inflammation with an M1 macrophage selective probe via GLUT1 as the gating target. *Nature Communications*, *13*(1), 5974. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33526-z>
- Crosby, H. A., Kelly, D. A., & Strain, A. J. (2001). Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology*, *120*(2), 534–544. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.21175>
- de Coppi, P., Bartsch, G., Siddiqui, M. M., Xu, T., Santos, C. C., Perin, L., Mostoslavsky, G., Serre, A. C., Snyder, E. Y., Yoo, J. J., Furth, M. E., Soker, S., & Atala, A. (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, *25*(1), 100–106. <https://doi.org/10.1038/nbt1274>
- Dominici, M., le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

- Donizetti-Oliveira, C., Semedo, P., Burgos-Silva, M., Cenedeze, M. A., Malheiros, D. M. A. C., Reis, M. A. dos, Pacheco-Silva, A., & Câmara, N. O. S. (2011). Role of adipose tissue-derived stem cells in the progression of renal disease. *Einstein (São Paulo)*, 9(1), 36–45. <https://doi.org/10.1590/s1679-45082011ao1833>
- Efstratiadis, G., Divani, M., Katsioulis, E., & Vergoulas, G. (2009). Renal fibrosis. *Hippokratia*, 13(4), 224–229.
- Eirin, A., Zhu, X.-Y., Puranik, A. S., Tang, H., McGurren, K. A., van Wijnen, A. J., Lerman, A., & Lerman, L. O. (2017). Mesenchymal stem cell–derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation. *Kidney International*, 92(1), 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.12.023>
- Engela, A. U., Hoogduijn, M. J., Boer, K., Litjens, N. H. R., Betjes, M. G. H., Weimar, W., & Baan, C. C. (2013). Human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells induce functional *de-novo* regulatory T cells with methylated FOXP3 gene DNA. *Clinical and Experimental Immunology*, 173(2), 343–354. <https://doi.org/10.1111/cei.12120>
- Foster, B., Zaidi, D., Young, T., Mobley, M., & Kerr, B. (2018). CD117/c-kit in Cancer Stem Cell-Mediated Progression and Therapeutic Resistance. *Biomedicines*, 6(1), 31. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010031>
- Gomes, S. A., Hare, J. M., & Rangel, E. B. (2018, abril 1). *Kidney-Derived c-Kit+ Cells Possess Regenerative Potential*. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0232>
- Gouveia, D. S. e S., Bignelli, A. T., Hokazono, S. R., Danucalov, I., Siemens, T. A., Meyer, F., Santos, L. S., Martins, Z. C. L., Mierzwa, T. C., & Furquim, R. (2017). Analysis of economic impact among modalities of renal replacement therapy. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 39(2). <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20170019>
- Hamzaoui, M., Djerada, Z., Brunel, V., Mulder, P., Richard, V., Bellien, J., & Guerrot, D. (2020). 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6JRj mice. *Scientific Reports*, 10(1), 1524. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58393-w>

- Hoffman, L. M., & Carpenter, M. K. (2005). Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 23(6), 699–708. <https://doi.org/10.1038/nbt1102>
- Hubbard, S. R. (2004). Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(6), 464–471. <https://doi.org/10.1038/nrm1399>
- Humphreys, B. D., Czerniak, S., DiRocco, D. P., Hasnain, W., Cheema, R., & Bonventre, J. v. (2011). Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), 9226–9231. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100629108>
- Humphreys, B. D., Valerius, M. T., Kobayashi, A., Mugford, J. W., Soeung, S., Duffield, J. S., McMahon, A. P., & Bonventre, J. v. (2008). Intrinsic Epithelial Cells Repair the Kidney after Injury. *Cell Stem Cell*, 2(3), 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.01.014>
- Jain, A. K., Blake, P., Cordy, P., & Garg, A. X. (2012). Global Trends in Rates of Peritoneal Dialysis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(3), 533–544. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011060607>
- Jankowski, J., Floege, J., Fliser, D., Böhm, M., & Marx, N. (2021). Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease. *Circulation*, 143(11), 1157–1172. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050686>
- Kajstura, J., Rota, M., Hall, S. R., Hosoda, T., D'Amario, D., Sanada, F., Zheng, H., Ogórek, B., Rondon-Clavo, C., Ferreira-Martins, J., Matsuda, A., Arranto, C., Goichberg, P., Giordano, G., Haley, K. J., Bardelli, S., Rayatzadeh, H., Liu, X., Quaini, F., ... Anversa, P. (2011). Evidence for Human Lung Stem Cells. *New England Journal of Medicine*, 364(19), 1795–1806. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1101324>
- Kliem, V., Johnson, R. J., Alpers, C. E., Yoshimura, A., Couser, W. G., Koch, K. M., & Floege, J. (1996). Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney International*, 49(3), 666–678. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.95>

- Lammie, A., Drobnjak, M., Gerald, W., Saad, A., Cote, R., & Cordon-Cardo, C. (1994). Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 42(11), 1417–1425. <https://doi.org/10.1177/42.11.7523489>
- Lenihan, C. R., Myers, B. D., & Tan, J. C. (2016). Glomerular Function and Structure in Living Donors: Lessons from Single Nephron Studies. *Current Transplantation Reports*, 3(1), 24–32. <https://doi.org/10.1007/s40472-016-0092-y>
- Lennartsson, J., & Rönstrand, L. (2012). Stem Cell Factor Receptor/c-Kit: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiological Reviews*, 92(4), 1619–1649. <https://doi.org/10.1152/physrev.00046.2011>
- Lin, F., Moran, A., & Igarashi, P. (2005). Intrarenal cells, not bone marrow–derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1756–1764. <https://doi.org/10.1172/JCI23015>
- Lipworth, L., Mumma, M. T., Cavanaugh, K. L., Edwards, T. L., Ikizler, T. A., E. Tarone, R., McLaughlin, J. K., & Blot, W. J. (2012). Incidence and Predictors of End Stage Renal Disease among Low-Income Blacks and Whites. *PLoS ONE*, 7(10), e48407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048407>
- Metsuyanin, S., Harari-Steinberg, O., Buzhor, E., Omer, D., Pode-Shakked, N., Ben-Hur, H., Halperin, R., Schneider, D., & Dekel, B. (2009). Expression of Stem Cell Markers in the Human Fetal Kidney. *PLoS ONE*, 4(8), e6709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006709>
- Miliaras, D. (2004). KIT expression in fetal, normal adult, and neoplastic renal tissues. *Journal of Clinical Pathology*, 57(5), 463–466. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.013532>
- Noronha, I. L., Cavaglieri, R. C., Janz, F. L., Duarte, S. A., Lopes, M. A. B., Zugaib, M., & Bydlowski, S. P. (2011). The potential use of stem cells derived from human amniotic fluid in renal diseases. *Kidney International Supplements*, 1(3), 77–82. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.18>
- Ogawa, M., Nishikawa, S., Yoshinaga, K., Hayashi, S., Kunisada, T., Nakao, J., Kina, T., Sudo, T., Kodama, H., & Nishikawa, S. (1993). Expression and function of c-Kit in

- fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. *Development*, 117(3), 1089–1098. <https://doi.org/10.1242/dev.117.3.1089>
- Ostberg, J. R., Barth, R. K., & Frelinger, J. G. (1998). The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunology Today*, 19(12), 546–550. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(98\)01343-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(98)01343-7)
- Peng, X., Xu, H., Zhou, Y., Wang, B., Yan, Y., Zhang, X., Wang, M., Gao, S., Zhu, W., Xu, W., & Qian, H. (2013). Human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuate cisplatin-induced acute and chronic renal injury. *Experimental Biology and Medicine*, 238(8), 960–970. <https://doi.org/10.1177/1535370213497176>
- Perin, L., Sedrakyan, S., Giuliani, S., da Sacco, S., Carraro, G., Shiri, L., Lemley, K. v., Rosol, M., Wu, S., Atala, A., Warburton, D., & de Filippo, R. E. (2010). Protective Effect of Human Amniotic Fluid Stem Cells in an Immunodeficient Mouse Model of Acute Tubular Necrosis. *PLoS ONE*, 5(2), e9357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009357>
- Qian, X., An, N., Ren, Y., Yang, C., Zhang, X., & Li, L. (2021). Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes. *Stem Cell Reviews and Reports*, 17(2), 411–427. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10040-7>
- Rangel, E. B., Gomes, S. A., Dulce, R. A., Premer, C., Rodrigues, C. O., Kanashiro-Takeuchi, R. M., Oskouei, B., Carvalho, D. A., Ruiz, P., Reiser, J., & Hare, J. M. (2013). C-Kit+ Cells Isolated from Developing Kidneys Are a Novel Population of Stem Cells with Regenerative Potential. *Stem Cells*, 31(8), 1644–1656. <https://doi.org/10.1002/stem.1412>
- Rangel, E. B., Gomes, S. A., Kanashiro-Takeuchi, R., Saltzman, R. G., Wei, C., Ruiz, P., Reiser, J., & Hare, J. M. (2018). Kidney-derived c-kit+ progenitor/stem cells contribute to podocyte recovery in a model of acute proteinuria. *Scientific Reports*, 8(1), 14723. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33082-x>
- Roemeling-van Rhijn, M., Mensah, F. K. F., Korevaar, S. S., Leijts, M. J., van Osch, G. J. V. M., IJzermans, J. N. M., Betjes, M. G. H., Baan, C. C., Weimar, W., & Hoogduijn, M. J. (2013). Effects of Hypoxia on the Immunomodulatory Properties

- of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem cells. *Frontiers in Immunology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00203>
- Röszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2015/816460>
- Sagrinati, C., Netti, G. S., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Liotta, F., Frosali, F., Ronconi, E., Meini, C., Gacci, M., Squecco, R., Carini, M., Gesualdo, L., Francini, F., Maggi, E., Annunziato, F., Lasagni, L., Serio, M., Romagnani, S., & Romagnani, P. (2006). Isolation and Characterization of Multipotent Progenitor Cells from the Bowman's Capsule of Adult Human Kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(9), 2443–2456. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010089>
- Schmidt-Ott, K. M., Yang, J., Chen, X., Wang, H., Paragas, N., Mori, K., Li, J.-Y., Lu, B., Costantini, F., Schiffer, M., Bottinger, E., & Barasch, J. (2005). Novel Regulators of Kidney Development from the Tips of the Ureteric Bud. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(7), 1993–2002. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004121127>
- Semedo, P., Correa-Costa, M., Antonio Cenedeze, M., Maria Avancini Costa Malheiros, D., Antonia dos Reis, M., Shimizu, M. H., Seguro, A. C., Pacheco-Silva, A., & Saraiva Câmara, N. O. (2009). Mesenchymal Stem Cells Attenuate Renal Fibrosis Through Immune Modulation and Remodeling Properties in a Rat Remnant Kidney Model. *Stem Cells*, 27(12), 3063–3073. <https://doi.org/10.1002/stem.214>
- Silva, S. B., Caulliraux, H. M., Araújo, C. A. S., & Rocha, E. (2016). Uma comparação dos custos do transplante renal em relação às diálises no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 32(6). <https://doi.org/10.1590/0102-311x00013515>
- Sociedade Brasileira de Nefrologia. ([s.d.]). *Jornal Brasileiro de nefrologia: [órgão oficial de Sociedade Brasileira de Nefrologia]*. Associação Médica Brasileira. Recuperado 1º de dezembro de 2022, de <https://www.bjnephrology.org/en/article/doenca-renal-cronica-definicao-epidemiologia-e-classificacao/>

Thomé, F. S., Sesso, R. C., Lopes, A. A., Lugon, J. R., & Martins, C. T. (2019). Brazilian chronic dialysis survey 2017. *Brazilian Journal of Nephrology*, *41*(2), 208–214. <https://doi.org/10.1590/2175-8239-jbn-2018-0178>

Webster, A. C., Nagler, E. v, Morton, R. L., & Masson, P. (2017). Chronic Kidney Disease. *The Lancet*, *389*(10075), 1238–1252. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32064-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32064-5)