

DAYSEANNY DE OLIVEIRA BEZERRA

**USO TERAPÊUTICO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E
CÉLULAS PROGENITORAS RENAIIS NA SÍNDROME DE
ISQUEMIA/REPERFUSÃO RENAL EM SUÍNOS**

TERESINA
2018

DAYSEANNY DE OLIVEIRA BEZERRA

**USO TERAPÊUTICO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E
CÉLULAS PROGENITORAS RENAIIS NA SÍNDROME DE
ISQUEMIA/REPERFUSÃO RENAL EM SUÍNOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

TERESINA
2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

B574u Bezerra, Dayseanny de Oliveira

Uso terapêutico de células-tronco mesenquimais e células progenitoras renais na síndrome de isquemia / reperfusão renal em suínos / Dayseanny de Oliveira Bezerra – 2018.

58 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2018.

Orientação: Prf^a. Dr^a. Maria Acelina Martins de Carvalho

1. Terapia celular 2. Rim 3. Células progenitoras 4. Células-tronco mesenquimais 5. Lesão renal aguda I. Título.

CDD 636.089 55

**USO TERAPÊUTICO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E CÉLULAS
PROGENITORAS RENAIS NA SÍNDROME DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO
RENAL EM SUÍNOS**

DAYSEANNY DE OLIVEIRA BEZERRA

Tese aprovada em: 29/05/2018

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



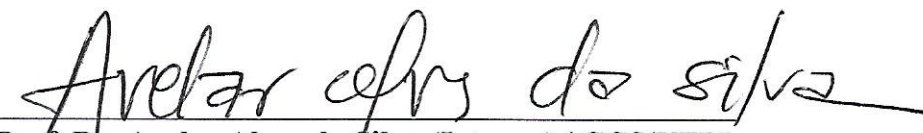
Prof. Dra. Clautina Ribeiro de Moraes da Costa (Externa) / IFPI



Prof. Dr. Lindolfo da Silva Meirelles (Externo) / ULBRA



Prof. Dra. Silvia de Araujo Franca Baeta (Interna) / DCCV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Avelar Alves da Silva (Interno) / CCS/UFPI



Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto (Interno) / DCCV/CCA/UFPI

À todas as pessoas que neste momento se encontram na lista de espera para doação de rins

À minha orientadora, sempre dedicada, atenciosa, por todo o tempo e paciência aplicado à minha formação científica

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, meus alicerces

Ao meu esposo, pelo companheirismo, apoio e incentivo

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me conceder a vida e me permitir ser instrumento da ciência.

À minha família por toda compreensão nos momentos de ausência, pelo incentivo e amor. Em especial, ao meu esposo Kenilson Marques por todo o amor, por todas as palavras de conforto e atenção nesses 4 anos de doutoramento.

À Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, pela minha formação acadêmica;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro à pesquisa desenvolvida;

À Prof. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho pela dedicação, disponibilidade, atenção e carinho. Minha base científica, docente, exemplo de força, fidelidade, integridade moral e profissional.

À equipe de cirurgia experimental do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células Tronco (NUPCelt), em especial, a doutoranda Elis Rosélia pelo companheirismo e dedicação. E aos colaboradores Hermínio José, Charlys Hands, Huanna Rodrigues, Ronielle Sousa e anestesista Catarina Silva, pela seriedade e compromisso em todos os procedimentos anestésico-cirúrgicos.

Ao médico urologista Giuliano Aita por todos os ensinamentos cirúrgicos que permitiram o sucesso dos procedimentos desta pesquisa. Ao Prof. Dr. Avelar Silva pela disponibilidade de tempo e transferência de conhecimento na área da nefrologia.

Ao Prof. Dr. Napoleão Argolo Neto, pelo incentivo e disponibilidade, dedicação e atenção.

À pós-doutoranda Lucilene Silva por toda ajuda na confecção e leitura das lâminas histológicas; À Dra. Yulla

Carvalho e doutoranda Camila Ernanda por todos os ensinamentos sobre cultivo celular.

À técnica do Laboratório de Cultivo Celular do NUPCelt/UFPI, Janete Sousa e em especial à operadora de micro Fabiana Mousinho pelo profissionalismo, atenção e amizade. Às funcionárias Flávia, Luciana e Leiliane, pela atenção, amizade e preparo dos materiais para a realização dos procedimentos durante o experimento.

Aos alunos de pós-graduação e iniciação científica, integrantes do NUPCelt, pela amizade, apoio, confiança e incentivo;

À patologista clínica Marina Carneiro pelo pronto atendimento e carinho.

Aos professores Daniel Louçana, Silvana Silva, Miguel Cavalcante pela atenção e disponibilidade.

Ao laboratório de doenças infecciosas do LASAN/UFPI em nome da profa. Maria do Socorro, e doutorando Leopoldo Maçal pela ajuda na realização dos testes imunológicos.

Ao Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular LIB/UFPI pela utilização do citômetro de fluxo em nome do Prof Adalberto Silva e Técnico laboratorial Raimundo Nonato.

Ao Hospital Veterinário Universitário, sob direção do Prof Macedo, pelo pronto atendimento no auxílio de determinados materiais e medicamentos especiais.

Ao Felipe e Adriano, funcionários do setor de suinocultura da UFPI, pelo cuidado e atenção no manejo dos animais;

Aos amigos do Instituto Federal do Piauí e direção do campus Paulistana-PI, por todo incentivo e compressão nesse período de doutoramento.

E por fim, aos meus queridos amigos, por todos os momentos de descontração, apoio e incentivo;

Muito Obrigada!

Inteligência é a capacidade de se adaptar a mudanças. A genialidade é, antes de tudo, a habilidade de aceitar a disciplina.

(Stephen Hawking)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	13
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO I	23
RESUMO	24
INTRODUÇÃO	25
METODOLOGIA	25
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	33
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO II	39
RESUMO	40
INTRODUÇÃO	41
METODOLOGIA	42
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	49
CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	53
CONCLUSÕES GERAIS	57

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	Página
Figura 1. CTMMO-su em cultivo. (A) monocamada celular, fibroblastoide e aderente. (B) coloração com <i>giemsa</i> , núcleos arredondados e citoplasma com expansões laterais.	28
Figura 2. CPHCR-su em cultivo. (A) Morfologia epiteliode/fibroblastoide, percebe-se que as células são volumosas, aderentes ao plástico e umas às outras, P1 aos 5 dias. (B) Células com núcleo arredondado e elipsoide, com nucléolos evidentes e citoplasma com vacúolos, corante Giemsa, P1 aos 5 dias. (C) e (D) cultura homogênea em P2 aos 8 dias.	29
Figura 3. Ensaio de UFC-F, corante Giemsa. (A) CTMMO-su. (B) CPHCR-su.	29
Figura 4. Curva de crescimento celular de CTMMO-su, em concentração inicial de $7,6 \times 10^3$ células.	30
Figura 5. Curva de crescimento celular de CPHCR-su, em concentração inicial de $7,6 \times 10^3$ células.	30
Figura 6. Ensaio de diferenciação celular. (A) controle adipogênico; (B e C) CPHCR-su em P2 e P4; (D) adipogênica CTMMO-su, vacúolos lipídicos no citoplasma corados com Oil red (cabeça de seta). (E e G) controle osteogênico CTMMO-su e CPHCR-su, respectivamente; (F, H, I) CTMMO-su, CPHCR-su em P2 e P4, com matriz óssea corada com alizarin red., respectivamente. (J, M) controle condrogênico CTMMO-su e CPHCR-su, respectivamente; (K, L, N, O) diferenciação condrogênica positiva de CTMMO-su, CPHCR-su em P2 e P4, proteoglicanos corados em azul por Alcian blue. (G, H e I).	31
Figura 7. Análise da expressão de marcadores celular por citometria de fluxo. (A,B,C) Branco fluorocromos FITC, APC e PE; (D) CD14, FITC; (E) CD90, APC e (F) CD105, PE; (G) População de CTM; (H) CD140b, APC; e (I) CD133, APC.	32
Figura 8. Análise da expressão de marcadores celular por citometria de fluxo das CPHCR-su. (A,B,C) Branco (sem marcação por anticorpos), fluorocromos: FITC, APC e PE; (D e G) CPHCR-su em P2; (E) CD14 (FITC); (F) CD90 (APC) e CD105 (PE); (H) CD133 (APC); (I) CD140b (APC). (J e M) CPHCR-su em P4; (K) CD90 (APC) e CD105 (PE); (L) CD14 (FITC); (N) CD140b (APC); (O) CD133 (APC).	33
Figura 9. Caracterização e classificação das células progenitoras. As células embrionárias dão origem à células totipotentes que se replicam em células com capacidade de se transformar em diversos tipos celulares e positivas para marcadores de pluripotência. Estas células dão origem à células multipotentes que possuem maior restrição de plasticidade que as suas ancestrais, essas células expressam marcadores de superfície específicos, nesta categoria, se enquadram as Células-tronco mesenquimais (CTM) e Células progenitoras renais (CPR). Por sua plasticidade podem se transformar em diversos tipos celulares conforme a sinalização célula-célula <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dando origem a células com menor potencial de diferenciação, oligopotentes ou unipotentes que são comprometidos com a reparação e regeneração específica para cada órgão destinado.	35
CAPÍTULO 2	
Fig 1. Valores de PU/CU (A) e GGT urinária (B). Proteinúria (C) em relação ao tempo. GC: grupo controle, G1: CTMMO-su e G2: CPHCR-su.	45
Fig 2. Ultrassonografia renal. (A) Rim esquerdo antes da indução da lesão de IRR. (B) Rim esquerdo aos 04 dias após a IRR. (C) rim esquerdo após 08 dias pós IRR. (D) Rim direito antes da lesão de IRR. (E) Rim direito aos 04 dias pós-IRR. (F) Rim direito aos 08 dias após IRR. (G e H) Alterações da morfologia renal em relação ao tempo nos grupos experimentais (G1 e G2) e controle (GC), (G) rim direito; (H) rim esquerdo.	46
Fig 3. Perfil de citocinas TNF- α , IL-4 e IL-10, entre os grupos controle (GC), com CTMMO (G1) e CPR (G2) e entre os tempos de avaliação; (*) apresenta diferença significativa a 5%; (**) apresenta diferença significativa a 1%. (A) IL-4: apresentou valores maiores significativamente no G2 nos tempos 144h e 192h que o GC e G1. (B) IL-10: GC apresentou valores inferiores às 0h que o GC e G1; o G2 apresentou diferença estatística com o GC às 1h, 24h e 72h de avaliação (asterisco preto) e 24h e 72h com o G1 (asterisco vermelho). (C) TNF- α : G1 apresentou valores maiores estatisticamente que o GC e G1 às 24h.	47
Fig 4. Fotomicrografia do córtex renal de suínos processados histologicamente e corados com Hematoxilina-eosina para análise histopatológica no GC: controle, G1: CTMMO-su e G2; CPHCR-su. (A) Aumento do espaço urinário (seta dupla), necrose/apoptose tubular (seta), 400x. (B) Necrose/apoptose tubular e tubulorrexia (cabeça de seta), 400x; (C) Ectasia tubular (asterisco vermelho), 100x. (D) túbulos com degeneração vacuolar, ectasia tubular (setas duplas), 200x. (E) degeneração tubular vacuolar (seta), 200x. (F) necrose/apoptose tubular, tubulorrexia e degeneração vacuolar (círculo), 200x. (G) nefrite intersticial (círculo), 100x. Análise estatística das lesões do parênquima renal por teste não paramétrico Kruskal-Wallis: (H) degeneração tubular vacuolar G2 diferindo significativamente do GC aos 4 e 8 dias (asterisco preto) e 4 dias do G1 (asterisco vermelho)	48

($p < 0,05$); (I) Necrose/apoptose tubular, G2 diferindo significativamente do GC aos 4 e 8 dias (asterisco preto) e 4 dias do G1 (asterisco vermelho) ($p < 0,05$); (J) Ectasia tubular G2 diferindo significativamente do G1 aos 4 e 8 dias (asterisco vermelho) ($p < 0,05$). (K) Nefrite intersticial sem diferença estatística entre os grupos.

Fig 5. Rastreamento de células marcadas com nanocristais intracitoplasmáticos fluorescentes Qdots-655 no tecido renal, filtro azul. (A) Controle, 100x; (B e C) CTMMO-su no interstício renal, 50x, 400x, respectivamente; (D, E e F) CPHCR-su no interstício, túbulos e glomérulos renais, 200x, 200x e 400x, respectivamente.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Expressão positiva para marcadores de superfície celular por citometria de fluxo.

Página

32

RESUMO

A síndrome de isquemia/reperfusão renal (IRR) representa cerca de 70% das causas de morbimortalidade relacionadas à lesão renal aguda. Ocorre em diversas doenças, a exemplo da embolia da artéria renal, além de ser característica em transplantes renais. A IRR durante a agressão isquêmica leva à necrose tubular aguda e na reoxigenação celular é caracterizada pelo aumento na peroxidação lipídica, no dano celular e na redução da função de filtração e excreção renal. O objetivo deste estudo foi analisar o comportamento *in vitro* das células progenitoras renais de suínos do córtex renal (CPHCR-su) comparando às células-tronco mesenquimais da medula óssea de suínos (CTMMO-su), e avaliar seu potencial terapêutico na síndrome de isquemia/reperfusão renal. Foram utilizados amostras de medula óssea e fragmentos renais de suínos, para isolamento de CTMMO-su e CPHCR-su. Após estabelecimento da cultura, foram realizados ensaios de cinética celular, unidade formadora de colônia fibroblastoide (UFC-F), citometria de fluxo, diferenciação celular em três linhagens e avaliação da morfologia celular. Para avaliação da terapia celular, foram utilizados 15 suínos machos, saudáveis, com idade entre 60 a 70 dias, divididos em três grupos de cinco animais (GC – Controle, G1- tratamento com CTMMO-su e G2 - tratamento com CPHCR-su), os quais foram submetidos à nefropatia por modelo de isquemia total bilateral durante uma hora, seguido de reperfusão sanguínea. As CTMMO-su e CPHCR-su, foram marcadas com nanocristais fluorescentes (Q-tracker®). Nos animais do GC, foi infundido 1mL de solução fisiológica, via local; nos suínos do G1, a infusão de CTMMO-su (1×10^6 /animal); e no G2, CPHCR-su (1×10^6 /animal). Os animais foram avaliados por meio de ultrassonografia renal e urinálise, antes e após infusão celular e realizada análise histopatológica após quatro e oito dias do tratamento. Os resultados foram submetidos à análise estatística com dados paramétricos em parcela subdividida e comparação de médias por teste F e dados não paramétricos por teste Kruskal-Wallis a 5% de significância. As CPHCR-su e CTMMO-su apresentaram comportamento semelhante, aderência ao plástico, morfologia fibroblastoide, positivas ao ensaio de UFC-F, diferenciação em linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica. Na caracterização imunofenotípica, as CTMMO-su apresentaram-se CD14-/CD133-/CD105+/CD90+/CD140b+; as CPHCR-su em segunda passagem (P2), CD14-/CD105-/CD90+/CD140b+/CD133+; e em P4, CD14-/CD105-/CD90+/CD133-/CD140b-. As análises histopatológicas demonstraram diferenças estatísticas significativas, para as variáveis de degeneração tubular, necrose/apoptose tubular e ectasia tubular, com menor média para G2, comparado ao GC e G1, entretanto estes, não diferiram entre si ($p < 0,05$). Dessa forma, foi comprovado com relativa segurança, que as progenitoras isoladas do córtex renal suíno são multipotentes, com expressão similar as tronco mesenquimais medulares. É importante destacar a necessidade de estudos posteriores que determinem a genômica desta população multipotente, para corroborar ou questionar os resultados ora apresentados. Infere-se que o nicho cortical renal em suínos representa importante fonte de células progenitoras multipotentes com potencial para ensaios pré-clínicos, conforme demonstrado nos achados teciduais e laboratoriais desta pesquisa. Portanto, podemos concluir que os animais tratados com células progenitoras renais apresentaram melhores resultados teciduais, comparados aos dos grupos controle e tratamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea.

Palavras-chave: terapia celular; rim, células progenitoras, células-tronco mesenquimais, lesão renal aguda.

ABSTRACT

Renal ischemia / reperfusion syndrome (RRI) represents about 70% of the causes of morbidity and mortality related to acute kidney injury. It occurs in several diseases, such as renal artery embolism, besides being characteristic in renal transplants. IRR during ischemic aggression leads to acute tubular necrosis and cellular reoxygenation is characterized by increased lipid peroxidation, cellular damage, and reduced renal filtration and excretion function. The objective of this study was to analyze the in vitro behavior of porcine renal progenitor cells (PRPC) comparing to the mesenchymal stem cells of the porcine bone marrow (MSCBM-su), and to evaluate its therapeutic potential in renal ischemia / reperfusion syndrome . Samples of bone marrow and renal porcine fragments were used for the isolation of MSCBM-su and PRPC-su. After establishment of the culture, cell kinetics, fibroblast colony forming unit (CFU-F), flow cytometry, cell differentiation in three lines and cell morphology evaluation were performed. To evaluate cell therapy, 15 healthy male pigs, aged 60 to 70 days, divided into three groups of five animals (GC - Control, G1 treatment with MSCBM-su and G2 - PRPC treatment) , who underwent nephropathy by bilateral total ischemia model for one hour, followed by blood reperfusion. MSCBM-su and PRPC -su, were labeled with fluorescent nanocrystals (Q-tracker®). In the CG animals, 1mL of saline solution was infused locally; in the G1 swine, MSCBM-su infusion (1×10^6 / animal); and in G2, CPR-su (1×10^6 / animal). The animals were evaluated by means of renal ultrasonography and urinalysis, before and after cellular infusion and histopathological analysis was performed after four and eight days of treatment. The results were submitted to statistical analysis with parametric data in subdivided plot and comparison of means by F test and non-parametric data by Kruskal-Wallis test at 5% of significance. The PRPC -su and MSCBM-su presented similar behavior, adherence to plastic, fibroblast morphology, positive for the UFC-F assay, differentiation in chondrogenic, adipogenic and osteogenic lines. In the immunophenotypic characterization, MSCBM-su presented CD14- / CD133- / CD105 + / CD90 + / CD140b +; the second pass PRPC -su (P2), CD14- / CD105- / CD90 + / CD140b + / CD133 +; and in P4, CD14- / CD105- / CD90 + / CD133- / CD140b-. Histopathological analyzes demonstrated significant statistical differences for tubular degeneration, tubular necrosis / apoptosis and tubular ectasia, with a lower mean for G2, compared to GC and G1, but these did not differ between groups ($p < 0.05$). Thus, it has been proven with relative safety, that the progenitors isolated from the swine renal cortex are multipotent, with similar expression to the medullary mesenchymal trunk. It is salutary to stress the importance of further studies that determine the genomics of this multipotent population, to corroborate or question the results presented here. It is inferred that the renal cortical niche in pigs represents an important source of multipotent progenitor cells with potential for pre-clinical tests, as demonstrated in the tissue and laboratory findings of this study. Therefore, we can conclude that the animals treated with renal progenitor cells had better tissue results, compared to the control and treatment groups of mesenchymal stem cells of the bone marrow.

Keywords: cell therapy; kidney, progenitor cells, mesenchymal stem cells, acute kidney injury.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A lesão renal aguda (LRA) possui como características a alta mortalidade, morbidade e podem levar a perda irreversível da função renal. Sua fisiopatologia é complexa, envolve as interações do complexo imunológico-celular-hormonal levando a múltiplos danos nas células, sendo muitas vezes, resistentes à terapia convencional. Como método mais eficaz para tratamento do paciente portador de doença renal crônica tem-se o transplante renal (BATISTA et al., 2017). Porém, apresenta dificuldades, como rejeições pelo paciente receptor, sobrevida diminuída do órgão transplantado e principalmente o número reduzido de doadores (PESTANA, 2017).

A Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO) registrou no período de janeiro a setembro de 2017, 20.595 pessoas na lista de espera para rins e durante este período somente 4.429 foram doados (ABTO, 2017), assim o número de doações abrange apenas, cerca de 21,5% da lista de espera. Dentre esses doadores, podemos perceber que aproximadamente 80% são falecidos (Tabela 1).

O tempo de isquemia quente é definido pelo período entre o clampeamento da artéria no doador até a perfusão com solução de preservação, nesse período o dano celular é mais evidente. Durante a isquemia quente, ocorre a interrupção abrupta da oferta de oxigênio para as células, com consequente redução do metabolismo aeróbico, suspensão da oxidação de glicose e ácidos graxos, e transferência da glicólise para a via anaeróbia, o que reduz, de forma significativa, a quantidade de trifosfato de adenosina (ATP) intracelular. O período correspondente à perfusão do enxerto até o desclampeamento da anastomose no receptor é o tempo de isquemia fria (TIF) (REQUIÃO-MOURA et al., 2015).

Tabela 1. Número de transplantes de órgãos sólidos e tecidos entre janeiro e setembro de 2017.

ÓRGÃOS					
Órgãos	Total	Vivo	Falecido	PMP	Nº Equipes
Coração	278	0	278	1,8	33
Fígado	1.564	142	1422	10,1	64
Pâncreas	19		19	0,1	14
Pâncreas/Rim	76		76	0,5	
Pulmão	76	1	75	0,5	7
Rim	4.429	870	3.559	28,6	127
Total	6.442	1.013	5.429		

Fonte: Registro Brasileiro de Transplantes de órgãos (ABTO., 2017).

A lesão de isquemia e reperfusão leva a Insuficiência Renal Aguda (IRA), que apresenta como sinais clínicos a elevação abrupta dos níveis séricos de ureia e creatinina (RAHMAN; SHAD; SMITH. MC, 2012). A disfunção tubular ocorre devido a debris e restos celulares que se depositam no interior dos túbulos, refluxo retrógrado do interstício do filtrado glomerular caracterizando assim a necrose tubular aguda (PADANILAM, 2003). Após a lesão, o rim sofre uma resposta regenerativa que conduz a recuperação da função renal, novas células são necessárias para substituir as danificadas, e três possíveis fontes são: células tubulares adjacentes, menos danificadas; células extra-renais, presumivelmente de origem de medula óssea ou células estaminais renais residentes (GUPTA et al., 2006).

A Isquemia/Reperfusão Renal (IRR) é uma síndrome complexa na qual estão envolvidos diversos mecanismos fisiopatológicos como a vasoconstrição inicial, danos tubulares e posteriormente lesões glomerulares. O processo inicia-se após a isquemia, quando ocorre a vasoconstrição, anóxia, a ativação das células endoteliais, o edema tubular, a necrose do epitélio tubular, seguido pelo edema intersticial, influxo celular de cálcio e a depleção do trifosfato de adenosina (ATP). A isquemia é caracterizada também pela redução parcial ou total de irrigação sanguínea no órgão, seguida pelo rápido decréscimo da taxa de filtração glomerular e do coeficiente de ultrafiltração capilar glomerular (BIRD et al., 1988; LANGE et al., 2005). A reperfusão é a grande responsável pelas principais lesões nas células do órgão com isquemia, este modelo simula inúmeras situações da prática clínica urológica, como revascularizações cirúrgicas das artérias renais, nefrectomias parciais, nefrolitotomias, porém, notadamente, o transplante renal é a ocorrência mais comum deste tipo de lesão no cotidiano da urologia (BIRD et al., 1988; ABSUR, 2012).

Durante a reperfusão renal, há o incremento na expressão das moléculas de adesão das células promovendo ativação leucocitária com aumento da produção de Espécies Ativas de Oxigênio (EAO), ao desenvolvimento do processo inflamatório e subsequente disfunção mitocondrial. As EAO atuam no período reperfusional com a reintrodução do oxigênio molecular no tecido previamente sob isquemia. Estas moléculas agem nos ácidos nucléicos e nas membranas celulares danificando-as por meio da peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados que resultam na formação de hidróxiperoxídeos inibindo assim processos enzimáticos e levando a célula à morte (HALIWELL, 2006). Além destes fatores, as EAO afetam diretamente o endotélio

promovendo e estendendo o processo inflamatório, ativando a reação endotelial e reiniciando o processo (LI e JACKSON, 2002; SCHNAKENBERG, 2002).

As mitocôndrias são importantes alvos dos danos causados pela IRR, pois nelas ocorre a diminuição da nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada com hidrogênio (NADH) desidrogenase, do carreador de adenosina difosfato/adenosina trifosfato (ADP/ATP) e da ATP sintetase, além do aumento na atividade da fosfolipase A2. Há ainda, aumento acentuado da quantidade de cálcio e aumento da geração de radicais livres pelas mitocôndrias. A associação destes eventos podem ser a causa das lesões e da morte celular decorrentes da reperfusão, possivelmente pelo fator de transição da permeabilidade da membrana mitocondrial interna (KONO et al., 1982; SILVA JR et al., 2002).

Os efeitos deletérios da síndrome isquemia/reperfusão renal são alvos de diversos estudos sobre terapias alternativas com uso de medicamentos como a clorpromazina, verapamil, alopurinol, octreotida, óleo de copaíba, vitaminas C, D e E e ciclosporina A, porém sem resultados satisfatórios (SHIH et al., 1988; YAMAKI et al., 2012). Ainda, alternativa de tratamento, para a lesão renal causada por IRR consiste na utilização da eritropoietina recombinante humana que tem demonstrado efeitos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos em dano isquêmico cerebral, lesão medular, e danos na retina (CELIK et al., 2002). Sua administração exogenamente, antes ou durante a reperfusão reduzida na lesão renal, reduz a necrose tubular e apoptose (YANG et al., 2003; VESEY et al., 2004; SHARPLES et al., 2004). Desta forma, novas estratégias são necessárias para reparar o parênquima renal e preservar sua função. O uso de células-tronco mesenquimais (CTM) confere proteção renal por estas células possuírem propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladora e expressarem fatores de crescimento que são alvo de múltiplas cascatas nos mecanismos da nefropatia isquêmica (DEANS; MOSELEY, 2000; LANGE et al., 2005; ZHU et al., 2013).

A presença de células plásticas aderentes obtidas a partir de células mononucleares da medula óssea de camundongos foi observada pela primeira vez em 1970, e receberam a denominação de unidades formadoras de colônias (UFC-F). Devido a capacidade de gerar descendentes clonogênicos, como osteoblastos, adipócitos e condrócitos, estas células foram denominadas células-tronco mesenquimais (FRIEDENSTEIN, CHAILAKHJAN, LALYKINA, 1970). Estas células podem ser aspiradas da medula óssea (MO) em uma concentração de 10-100 CTM por 1×10^6 células de MO (BRUDER et al., 1994; CAMPAGNOLI et al., 2001; HERNIGOU et al., 2005).

Para a confirmação que uma célula-tronco seja de fato uma CTM, segundo a International Society for Cellular Therapy em primeiro lugar, deve ser plástica-aderente quando mantida em condições de cultura convencionais, utilizando frascos de cultura de tecido. Em segundo lugar, 95% da população CTM deve expressar positividade para CD105, CD73 e CD90 por citometria de fluxo. Além disso, expressar negatividade para CD45, CD34, CD14, CD11b ou, CD79a ou CD19 e de HLA de classe II. Em terceiro lugar, as células devem ser capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos em condições *in vitro* de diferenciação (HORWITZ et al., 2005; DOMINICI et al., 2006).

A utilização das CTM tem demonstrado efeitos sobre o reforço da recuperação da função renal em lesão renal aguda (LRA) causada por I/R, por fornecer a base para um novo conceito terapêutico para seu tratamento, com melhora dos valores de creatinina e ureia, séricas, e histopatologicamente, diminuição da nefrite e lesões tubulares no grupo tratado com CTM da medula óssea de rato (LANGE et al., 2005). Estas células demonstraram ter capacidade imunomoduladoras (FRANK e SAYEGH, 2004), expressarem fatores de crescimento com caráter renoprotetor na insuficiência renal aguda experimental (BRUNO; BUSSOLATI, 2013). Semelhantes achados foram relatados por Patel et al. (2012) em que a administração de CTM derivadas de tecido de granulação acelerou a recuperação em ratos com LRA induzida por isquemia/reperfusão, efeito que pode ser mediado pela ação parácrina de fatores de crescimento e imunossupressores segregados por estas células. Fisiologicamente, as CTM podem se diferenciar em cardiomiócitos (JOUNI et al., 2015), hepatócitos (GODOY et al., 2015), células renais (LINDGREN et al., 2011) e epitelial pulmonar (DESAY et al., 2014).

Outra alternativa de tratamento para a lesão renal, porém em fase experimental, consiste no uso de Células progenitoras renais (CPR). Essa subpopulação de células pode ser cultivada e expandida em cultura, se expressa em vários estágios de subcultura e são capazes de formar tecido *in vivo*, podendo possivelmente ser usada como opção potencial no tratamento para a anemia provocada por insuficiência renal crônica (ABOUSHWAREB et al., 2008). Contudo, os resultados quanto ao seu uso para tratamento de insuficiência renal aguda ocasionada por isquemia-reperfusão permanecem pouco elucidados.

Em estudo realizado por Bussolati et al. (2005) foi demonstrado no rim adulto humano normal a presença de uma população residente de células progenitoras com potencial de expansão e de auto-renovação e que expressam positividade para o marcador

CD133. Estas células podem responder a uma estimulação do ambiente local, com diferenciação em células endoteliais ou epiteliais tubulares, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Gupta et al. (2006) isolou células progenitoras renais multipotentes a partir de rins de ratos, estas células se comportaram como células-tronco renais, podendo ser cultivadas durante várias duplicações da população, sem evidência de senescência ou transformação maligna. As características únicas dessas células renais derivadas incluem expressão de marcadores que são consistentes com pluripotência como o fator de transcrição de células-tronco Oct4, a expressão da Pax-2, um marcador expresso por outras células estaminais renais e a capacidade das células de diferenciação em relação a células que são derivadas a partir das três camadas de células germinais.

A presença de células-tronco no rim adulto tem implicações importantes para a compreensão do volume de células normais no rim e da fonte de regeneração de células após a lesão renal aguda. Estas células podem diferenciar-se em células tubulares, quando injetadas, no rim normal e lesionado, assim essas células progenitoras renais participam na resposta regenerativa do rim endógeno (MEIRELLES et al., 2006; QI et al., 2007).

Em modelo de lesão tubular aguda induzida por glicerol em ratos foram avaliados o efeito protetor e a localização das células progenitoras renais CD133 + da medula renal interna humana comparando-os com os resultados obtidos com tratamento de CTM derivadas da medula óssea. Foi descoberto que as células progenitoras CD133+ promoveram a recuperação da função renal, a prevenção de necrose tubular e celular, a estimulação da proliferação celular e a sobrevivência residente, semelhante às CTM. Além disso, por análise de imagem óptica, as células progenitoras CD133 + tiveram acúmulo no tecido renal, e foram observadas em concentração reduzida no pulmão, baço, fígado. As CTM foram detectadas em níveis semelhantes no tecido renal, mas com maior concentração destas células em órgãos extra-renais. Ambos os tipos de células produziram vários fatores de crescimento e citocinas, o que sugere que uma combinação de diferentes mediadores está envolvida na sua ação biológica. Estes resultados indicam que as células CD133 + progenitoras humanas são renotrópicas e capazes de melhorar a regeneração renal na lesão renal aguda (GRANGE, et al., 2014).

Os suínos domésticos e o *minipig* são modelos relevantes em muitos campos da pesquisa médica (LUNNEY, 2007). Atualmente, estudos vêm sendo realizados para obtenção de novos modelos suídeos. Assim, o cateto (*Tayassuta jacu*), tayassuideo representa um bom modelo para nefropatia isquêmica induzida por clampeamento parcial da artéria renal (BEZERRA et al., 2014). Ainda, estudos foram realizados sobre o

isolamento, cultivo e o potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo nesses animais (PESSOA et al., 2014) e da medula óssea (ARGOLO NETO et al., 2016) demonstrando seu potencial como modelo para futuras pesquisas nesta área.

Os suínos domésticos são animais de médio porte, altamente reprodutivos, com precoce maturidade sexual (com 5-8 meses), parto da prole múltipla (uma média de 10-12 leitões por ninhada) e gestação relativamente curta de 115 a 120 dias (WOLF et al., 2000). São animais onívoros e possuem semelhanças com os seres humanos, quanto à sua anatomia, fisiologia, metabolismo e patologia (AIGNER et al., 2010). Anatomicamente, o rim desses animais se apresenta multipiramidal ou multilobar com superfície externa lisa evidente (SISSON e GROSSMAN, 1986; DYCE et al., 2010).

Apesar dos roedores (ratos e camundongos) serem animais bastante utilizados em pesquisas biomédicas, os suínos domésticos apresentam-se mais próximos filogeneticamente dos humanos. Segundo uma análise evolutiva inicial baseada em 3,84 milhões de sequências *shotgun* do genoma destas espécies (WERNERSSON et al., 2005). Este fato foi confirmado pela comparação das sequências codificantes de proteínas utilizando alinhamentos de cDNA completo com mais de 700kb de humano, rato e porco, onde a maior parte da árvore de gênica dos roedores pertenceram a um grupo externo aos primatas e artiodáctilos (JORGENSEN et al., 2005). Assim, o suíno consiste em um relevante modelo animal para pesquisas científicas.

A medicina regenerativa recebe grande destaque no panorama atual por representar uma alternativa para tratamentos de doenças letais como a doença renal. Contudo, necessita-se de maiores informações em relação a esta doença, principalmente, para possibilitar a eficácia da terapia. Sabe-se que o uso terapêutico, correlacionado de CTM com CPR, nos danos da isquemia/reperfusão renal e sua resposta imunológica, ainda não estão totalmente esclarecidos, são relevantes pesquisas que proporcionem a introdução de terapias alternativas para a Lesão Renal Aguda e Crônica na rotina hospitalar, que aumentem a vida do órgão transplantado e possam até mesmo proporcionar a redução das filas de espera para doação de rins.

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o comportamento *in vitro* das células progenitoras renais de suínos (CPHCR-su) comparando às células-tronco mesenquimais da medula óssea de suínos (CTMMO-su), e avaliar o potencial terapêutico dessas células na síndrome de isquemia/reperfusão renal.

Este trabalho encontra-se estruturado conforme a Resolução 001/03-CCMCA de 22.05.2003, que estabelece normas editoriais do Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal. À vista disso, encontra-se dividido em: Introdução e Referencial Teórico do assunto pesquisado, seguida de dois capítulos elaborados em formato de artigo científico. O capítulo I intitulado “**Multipotencialidade de células-tronco mesenquimais e de células progenitoras heterogêneas do córtex renal de suínos: semelhanças ou artefatos?**”, de acordo com as normas do periódico *Experimental Cell Research*; o capítulo II intitulado “**Efeito renoprotetor comparativo entre células progenitoras heterogêneas do córtex renal de suínos e tronco mesenquimais em lesões de isquemia-reperfusão em suínos**”, segundo as normas do periódico *Plos One*.; e finalização do trabalho com as conclusões gerais.

REFERÊNCIAS

- ABOUSHWAREB, Tamer; ATALA, Anthony. Stem cells in urology. **Nature Clinical Practice Urology**, v. 5, n. 11, p. 621-631, 2008.
- ABSUR, H. Especialidades Médicas – Nefrologia. **Revista de Medicina**. Ed. 9. São Paulo. 49-51p, 2012.
- AIGNER, B. et al. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. **J Mol Med.**, v. 88, 653–664p, 2010.
- ARGOLO NETO, N. M. et al. Isolation, expansion, differentiation and growth kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 44, n. 1, p. 1–11, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS (ABTO). Registro Brasileiro de Transplantes - Veículo Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **ABTO**, v. Ano XXI, n. Nº 3, 2017.
- BATISTA, C. M. M. et al. Perfil epidemiológico dos pacientes em lista de espera para o transplante renal. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 30, n. 3, p. 280–286, 2017.
- BEZERRA D.O., et al., Collared Pecary (*tayassu tajacu*) as a new model of renal ischemic injury induced by clamping the renal artery. **Acta Cir. Bras.[online]**, v.29, n.9, 560-572p, 2014.
- BIRD, J. E. Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat: the relation between glomerular and tubular dysfunction. **Journal Clinical Investigation**, v. 81, 1630-1638p, 1988.
- BRUDER, S.P.; FINK, D. J.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. **J Cell Biochem**, v. 56, 283-294p, 1994.

BRUNO, S.; BUSSOLATI, B. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells on renal ischemia-reperfusion injury: a matter of genetic transfer? **Stem cell research & therapy**, v. 4, n. 3, p. 55, 2013.

BUSSOLATI, B. et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 2, 545-555p, 2005.

CAMPAGNOLI et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, 2396-2402p, 2001.

CELIK, M. et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, n.70, 2258– 2263p, 2002 .

CHEN et al. Genetic resources, genome mapping and evolutionary genomics of the pig (*Sus scrofa*). **Int J Biol Sci**, v. 3, 153–165p, 2007.

DEANS, R. J. ; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. **Exp Hematol**, v. 28, 875–884p, 2000.

DESAI, T.J.; BROWNFIELD, D.G.; KRASNOW, M.A. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. **Nature**, v. 507, n. 7491, p. 190-194, 2014.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, 315-317p, 2006.

DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. **Tratado de anatomia veterinária**. Elsevier, Brasil, 2004.

FRANK, M. H.; SAYEGH, M.H. Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells. **Lancet** , v. 363, 1411–1412p, 2004.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet.**, v. 3, 393-403, 1970.

GODOY, P. et al. Gene networks and transcription factor motifs defining the differentiation of stem cells into hepatocyte-like cells. **Journal of hepatology**, v. 63, n. 4, p. 934-942, 2015.

GRANGE, C. et al. Protective effect and localization by optical imaging of human renal CD133+ progenitor cells in an acute kidney injury model. **Physiological reports**, v. 2, n. 5, p. e12009, 2014.

GUPTA, S. et al. Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 17, 3028–3040p, 2006.

HALIWELL, B. Reactive species and oxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, 312-322p, 2006.

HERNIGOU, P. et al. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. **J Bone Joint Surg Am**, v. 87, 1430-1437p, 2005.

HORWITZ, E. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, 393-395p, 2005.

JORGENSEN, F.G. et al. Comparative analysis of protein coding sequences from human, mouse and the domesticated pig. **BMC**, v. 3, n.2, 2005.

JOUNI, M. et al. Toward Personalized Medicine: Using Cardiomyocytes Differentiated From Urine-Derived Pluripotent Stem Cells to Recapitulate Electrophysiological Characteristics of Type 2 Long QT Syndrome. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 9, p. e002159, 2015.

KONO, Y.; OSAWA, K., TANAKA, J. Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. **Transplantation**, v. 33, 150-155, 1982.

LANGE, C. et al. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. **Kidney International**, v. 68, 1613-1617p, 2005.

LI, C. e JACKSON, R. M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 212, 227-241p, 2002.

LINDGREN, D. et al. Isolation and Characterization of Progenitor-Like Cells from Human Renal Proximal Tubules. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 2, p. 828-837, 2011.

LUNNEY, J. K. Advances in swine biomedical model genomics. **Int J Biol Sci**, v. 3, 179-184p, 2007.

MEIRELLES, L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

PADANILAM, B. J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 284, 608-627p, 2003.7

PATEL, J. et al. Stem cells from foreign body granulation tissue accelerate recovery from acute kidney injury. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 27, n. 5, p. 1780-6, 2012.

PESSOA, G. T. et al. Isolation, culture and differentiation potential of collared peccary (*Tayassu tajacu*) adipose-derived stem cells. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, 2014.

PESTANA, J. M. Clinical outcomes of 11,436 kidney transplants performed in a single center - Hospital do Rim. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 39, n. 3, p. 0-0, 2017.

QI, W. et al. Isolation, propagation and characterization of primary tubule cell culture from human kidney (Methods in Renal Research). **Nephrology**, v. 12, n. 2, p. 155–159, 2007.

RAHMAN, M.; SHAD, F.; SMITH, MC. Acute Kidney Injury: A Guide to Diagnosis and Management. **American Family Physician**, v. 86, n. 7, p. 631–639, 2012.

REQUIÃO-MOURA, L. R. et al. Ischemia and reperfusion injury in renal transplantation: hemodynamic and immunological paradigms. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 1, p. 129–135, 2015.

SCHNAKENBERG, C.G. Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. **American Journal Physiology Regulatory Integrative Comp Physio**, v. 1, n. 282, 335-342p, 2002.

SHARPLES, E. J. et al. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, 2115-2124p, 2004.

SHIH, W. et al. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. **Kidney Int.**, v.33, n. 6, 1113-1118, 1988.

SILVA JR, O.C. et al. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, Suplemento 3, 2002.

SISSON e GROSSMAN, **Anatomia dos animais domésticos**. Aparelho urogenital de suínos. Guanabara Koogan, 1986.

VESEY, D. A. et al. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, 348-355p, 2004.

WERNERSSON, M. H. et al. Pigs in sequence space: a 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. **BMC Genomics**, v. 6, n. 70, 2005.

WOLF, E. et al. Transgenic technology in farm animals—progress and perspectives. **Exp Physiol**, n. 85, 615-625p, 2000.

YAMAKI, V. N. et al. Efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico remoto nas lesões da síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 39, n.6, 529-533p, 2012.

YANG, C. W. et al. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. **FASEB J**, v.17, 1754-1755p, 2003.

ZHU, X. Y.; LERMAN, A.; LERMAN, L.O. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell Treatment for Ischemic Kidney Disease. **Stem Cells Regenerative Medicine**, v. 31, n. 9, 2013.

CAPÍTULO I*

*Manuscrito elaborado segundo as normas do periódico *Experimental Cell Research*

MULTIPOTENCIALIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E DE CÉLULAS PROGENITORAS HETEROGÊNAS DO CÓRTEX RENAL DE SUÍNOS: SEMELHANÇAS OU ARTEFATOS?

Dayseanny de Oliveira Bezerra^I

Maria Acelina Martins de Carvalho^{II}

^I Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Brasil

^{II} Professora, Doutora, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Brasil.

Resumo

A maior eficácia da terapia celular para doenças degenerativas está diretamente relacionada a estudos que elucidem o comportamento e biologia destas células em cultivo. O objetivo desta pesquisa foi analisar o comportamento *in vitro* das células progenitoras heterogêneas do córtex renal de suínos (CPHCR-su) comparando às células-tronco mesenquimais da medula óssea de suínos (CTMMO-su). Foram utilizadas amostras de medula óssea e fragmentos renais de suínos, para isolamento de CTMMO-su e CPHCR-su, respectivamente. Após estabelecimento da cultura foram realizados ensaios de cinética celular, unidade formadora de colônia fibroblastoide (UFC-F), citometria de fluxo, diferenciação celular em três linhagens e avaliação da morfologia celular. As CPHCR-su e CTMMO-su apresentaram comportamento semelhante, aderência ao plástico, morfologia fibroblastoide, positivas ao ensaio de UFC-F, diferenciação em linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica. Na caracterização imunofenotípica, as CTMMO-su apresentaram-se CD14-/CD133-/CD105+/CD90+/CD140b+; as CPHCR-su em segunda passagem (P2), CD14-/CD105-/CD90+/CD140b+/CD133+; e em P4, CD14-/CD105-/CD90+/CD133-/CD140b-. Verificou-se, com relativa segurança, que as progenitoras isoladas do córtex renal suíno são multipotentes, com expressão similar às tronco mesenquimais medulares. É importante destacar a necessidade de estudos posteriores que determinem a genômica desta população multipotente, para corroborar ou questionar os resultados ora apresentados. No bojo deste estudo, infere-se que o nicho cortical renal em suínos representa importante fonte de células progenitoras multipotentes com potencial para ensaios pré-clínicos.

Palavras-chave: Rim, células tronco tecido-específicas, plasticidade, terapia celular.

Introdução

O rim consiste em um órgão com capacidade regenerativa, considerando a existência de um sistema renopoiético responsável por esta característica [1]. Órgão composto por diversos tipos de células, dentre elas, as tubulares proximais, que podem ser dotadas de um fenótipo que confere maior resistência à lesão renal aguda, permitindo repovoamento rápido dos túbulos [2]. Culturas primárias de células tubulares proximais (CTP) são representativas das condições fisiológicas do organismo. No entanto, como modelo para o estudo da proliferação celular humana e funções de transporte, apresenta desvantagem pela contaminação por fibroblastos e células do túbulo distal [3].

O epitélio tubular que regenera a necrose tubular aguda exibe longos trechos de células CD133+ / VIM+, confirmando que podem representar uma população de progenitoras [2]. Para caracterizar o fenótipo de células de ciclo lento presente no rim de ratos ou label-retaining cells (LRC), foi examinada a expressão de um marcador mesenquimal, vimentina, nos rins de ratos com marcação de bromodeoxiuridina (BrdU). Após lesão de isquemia/reperfusão, numa fase inicial da regeneração tubular, os descendentes de LRC expressaram um marcador mesenquimal, vimentina que se tornaram positivas para expressão epitelial, E-caderina, após múltiplas divisões celulares, sugerindo que as LRC consistem em uma fonte de células regeneradora para substituir as lesionadas [4].

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células multipotentes que podem dar origem a células mesodermis e não mesodermis em tecidos *in vitro* e *in vivo*. Considerando que *in vitro* a capacidade de transdiferenciação é bem conhecida, quanto à distribuição natural e biologia no organismo vivo, estudos com culturas de células a longo prazo demonstram sua presença em diferentes órgãos e tecidos de camundongos adultos [5]. Os pericitos (PC) correspondem às CTM *in vivo* e dão origem a CTM quando cultivados, mas comparando-se os perfis de expressão gênica os PC dão origem a CTM, e baixos níveis de células endoteliais podem persistir nas culturas CTM estabelecidas usando protocolos tradicionais [6].

O comportamento de células primárias renais tubulares em cultivo merece especial atenção, devido ao potencial terapêutico nas lesões tubulares renais. Sua caracterização, pureza em cultivo e mecanismos de ação ainda não estão totalmente elucidados [3]. No que se refere às características dessas células em rins de suínos, existem poucos relatos, no entanto, por ser um bom modelo experimental para pesquisas biomédicas, merece destaque, por sua proximidade filogenética com humanos [7,8]. O objetivo deste estudo foi analisar o comportamento *in vitro* das células progenitoras heterogêneas do córtex renal (CPHCR-su) comparando-as às células-tronco mesenquimais da medula óssea de suínos (CTMMO-su).

Metodologia

Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado com análise descritiva de médias, desvio padrão e avaliações qualitativas. Foram utilizados dois grupos representando amostras de 2 tipos de células, G1: CTMMO-su e G2: CPHCR-su. Os tratamentos entre os grupos foram ensaios de Unidade formadora de Colônia fibroblastóide (UFC-F), cinética

celular, diferenciação em 3 linhagens de células e caracterização imunofenotípica. Todos os protocolos utilizados seguiram as diretrizes para uso e experimentação animal e foram aprovados no Comitê de Ética em Uso Animal CEUA/UFPI sob nº 269/16.

Cultivo de Células-Tronco Mesenquimais da Medula Óssea

A coleta de medula óssea foi realizada em 3 porcos saudáveis, com idade entre 60 e 70 dias, provenientes do criatório de suínos do setor de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí (UFPI) alimentados com ração para suínos em fase inicial e água *ad libitum*. Por meio da punção da asa do íleo. Os animais foram devidamente anestesiados com ketamina (15 mg/kg) e midazolam (1 mg/kg) e analgesia com dipirona sódica (25mg/kg) e tramadol (2 mg/kg) por via intramuscular. Após tricotomia e antisepsia, foi realizada a palpação da região e 20 ml de medula óssea foram aspirados, com agulha 24G acoplada a uma seringa tipo *luer lock* heparinizada (Actiparin®-Heparina sódica Bergamo).

O isolamento e expansão das CTMMO foram realizados conforme protocolo descrito por Argolo Neto et al. [9]. Em resumo, o aspirado da medula óssea foi separado por gradiente de concentração e o halo de células mononucleares foi retirado, alicotado em tubo falcon contendo meio MEM alfa com adição de glutamax contendo 15% de Soro Fetal bovino, 1% de solução de antibiótico/antimicótico (10,000 uni/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25µg/mL de anfotericina B (ATB), 1% de glutamina, 1% de aminoácidos não essenciais. O conteúdo foi lavado em centrífuga por 10 minutos a 1500 rpm, o pellet ressuspenso em 2 ml de meio e cultivado em garrafa de 25cm².

Cultivo de Células progenitoras heterogêneas do córtex renal

O isolamento e cultivo de CPHCR-su foram realizados conforme adaptação de protocolo descrito por YAMALEYVA et al [10]. Resumidamente, fragmentos de córtex e medula renal foram coletados por meio de biópsia, lavados em solução de Krebs com 5% penicilina/estreptomicina, transferidos para uma placa de cultura, retirada cápsula renal, com bisturi separado o córtex, este foi picado com bisturi até atingir uma consistência gelatinosa.

O material foi transferido para um tubo *falcon* de 15mL com 7,5 mL de solução de KREBS aquecida a 37°C contendo 6mg de colagenase (Sigma Aldrich®). Durante 40 minutos esta solução foi incubada em estufa de CO₂ para cultura celular a 37°C e a cada 10 minutos, homogeneizada. Após este período, a enzima foi neutralizada (proporção de 1:1) com 7,5 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's) (Invitrogen® baixa glicose) mais 10% de soro fetal bovino (SFB). O conteúdo do tubo foi aspirado e filtrado em uma peneira com malha de 125µm, a solução filtrada foi submetida a três lavagens com PBS por centrifugação durante 5 minutos a 1500 rpm. Após este processo, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 2 mL de meio de cultivo para rim (MCR) na proporção de 1:1, contendo: meio A, DEMEM, 10% SFB e 1% de solução de antibiótico/antimicótico (10,000 uni/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25µg/mL de anfotericina B (ATB); e meio B: *Keratinocyte-Serum Free Medium* contendo L-glutamina, Fator de crescimento recombinante epidermal humano 1-53, extrato de pituitária bovina suplementado com 5% SFB, 1% ATB e insulina-transferrina-selênio (5 µg/mL, 2,75 µg/mL and 3,35 ng/mL, respectivamente). Após sucessivas

lavagens foi plaqueado em garrafa de 25cm² incubados à 37°C com 5% de CO₂. Os meios foram trocados inicialmente com 24h e depois com 48-72 horas usando o MCR para expansão celular.

Ensaio in vitro de UFC-F e cinética celular

Para o ensaio de Unidade Formadora de Colônia Fibroblastóide (UFC-F) foi alicotada uma amostra em P0 de CPHCR-su e CTMMO-su em garrafa de 12cm². Após o plaqueamento da fração mononuclear, foram realizadas as trocas de meio de cultivo até a formação do máximo de colônias bem delimitadas na superfície da placa. A garrafa foi observada diariamente para constatação da formação de colônias com mais de 20 células. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos e coradas com Giemsa por 10min à temperatura ambiente, lavando-se o excesso com água destilada. As colônias foram contadas sobre a superfície da garrafa de 12cm². O ensaio de cinética celular foi realizado por meio da curva de crescimento, inicialmente, alicotado 7,6x10³ células (CTMMO-su e CPHCR-su) em duplicata em uma placa de 24 poços. A cada 72horas a cultura foi tripsinizada para contagem, avaliação da viabilidade celular por azul de tripan e replaqueamento na proporção de 1:1. Este procedimento foi repetido até a exaustão completa da cultura.

Caracterização imunofenotípica das CPHCR-su e CTMMO-su

A imunofenotipagem foi realizada utilizando um painel de anticorpos para identificação do perfil de células presentes na cultura. Desta forma, foram utilizados marcadores positivos exclusivos para CTM: CD105 (Anti-CD105 PE -Abcam Cambridge, USA, 1:100, cód. ab53318) e CD140b (Anti-CD140b, APC, Thermo Fisher Scientific TM, USA, 10:100, cód. 17-1402-80). Marcadores positivos para CTM e CPR: CD90 (Anti-CD90 APC - Abcam Cambridge, USA, 1:100 cód. 555596) por ser também marcador positivo para fibroblastos; negativos para CTM e CPR: CD14 (Anti-CD14 FITC-Sigma, USA, 1:100, cód. C7673), expresso por células hematopoiéticas; e marcador positivo somente para células progenitoras renais: CD133 (Anti-CD133, APC, Thermo Fisher ScientificTM, USA, 12:100, cód. 11-1339-41), que reconhece o Prominin-1, expresso em células primárias epiteliais, hematopoiéticas, neurais e endoteliais e marcadores de tecidos embrionários. Além de uma amostra controle (branco) apenas com células sem utilizar anticorpos.

As células mantidas em expansão, CTMMO-su em quinta passagem (P5) e CPHCR-su, em segunda e quarta passagem (P2 e P4, respectivamente), foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS, posteriormente, 10⁶ células foram distribuídas em tubos para citometria de fluxo para cada um dos marcadores a serem analisados. Em cada tubo foi colocado 01 mL de tampão FACS [DBPS (Dubelco's Phosphate Buffer Solution) contendo 0,1% de BSA, centrifugadas 2000 rpm por 10 minutos para lavagem. As células foram incubadas com o anticorpo conjugado por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação as células foram lavadas uma vez com 01 mL tampão FACS para a retirada do excesso de anticorpo. As amostras foram analisadas utilizando um citômetro de fluxo Citômetro de Fluxo FACScanto® II e software BD FACSDiva software (Version 6.1.3), obtendo-se 30.000 eventos por amostra testada. As populações foram estimadas pela porcentagem das células expressando cada um dos marcadores em relação ao total

de células adquiridas por meio do software INFINICYT (version 5.1). Os resultados foram plotados em forma de histograma para melhorar avaliação.

Ensaio de diferenciação celular

As CTMMO-su e CPHCR-su foram induzidas a diferenciação em três linhagens, com meios de diferenciação STEMPRO® de acordo com protocolos do fabricante e segundo metodologia descrita por Costa et al. [11]. Resumidamente, para a diferenciação osteogênica e adipogênica foram alicotadas 1×10^4 células, em placa de 24 poços de cultivo, após 21 e 7 dias, respectivamente, fixadas em formaldeído a 4% e coradas com solução de *Alizarina Red* e *Oil red*, respectivamente. Para a diferenciação condrogênica foram plaqueadas 1×10^2 células em poço de 96 poços, fixadas em formaldeído a 4% e incubadas em solução de *Alcian blue*.

Resultados

Isolamento, cultivo e expansão de CTMMO-su e CPHCR-su

A coleta de medula óssea foi realizada sem dificuldades demonstrando que a região ilíaca constitui um bom sítio com um leito vascular apropriado para coleta de 40mL por animal. Na cultura de CTMMO-su, em 24 horas após o isolamento, foi observada uma monocamada de células arredondadas aderentes ao plástico. Após 72h do isolamento, foi adicionado meio de cultivo à garrafa, as células apresentaram-se fibroblastoides, fusiformes, com expansão do citoplasma, núcleo centralizado e nucléolos evidentes (Figura 1). Passados cinco dias, a cultura atingiu 95% de confluência, quando então, foi trypsinizada, contada e replaqueada, para expansão da cultura e realização dos ensaios *in vitro*.

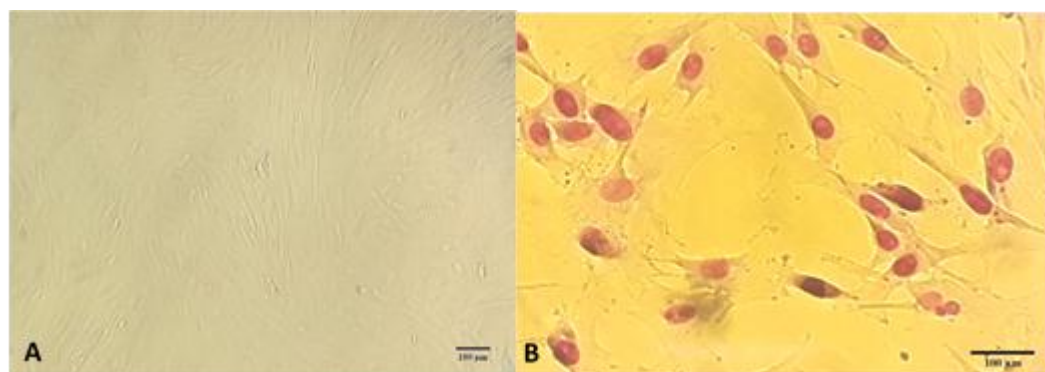


Figura 1. CTMMO-su em cultivo. (A) monocamada celular, fibroblastoide e aderente. (B) coloração com giemsa, núcleos arredondados e citoplasma com expansões laterais.

O isolamento de CPHCR-su mostrou-se eficaz, a cultura em P0 apresentava diversos tipos celulares, que após 24 horas do isolamento, não aderiram à placa. Posteriormente às 48h, o meio foi trocado, observavam-se células aderidas e com formato fibroblastoide/epitelioide (Figura 2A).

O citoplasma apresentou expansões e vacúolos dispersos em todo conteúdo, núcleo grande e centralizado com nucléolos evidentes (Figura 2B), foi possível observar a presença de outros tipos celulares. Após quatro dias, a cultura atingiu 95% de confluência, quando então foi trypsinizada, avaliada a viabilidade, concentração celular e

replaqueamento para expansão e ensaios *in vitro*. Em P2 a cultura estava homogênea sem a presença de debris celulares ou outros tipos celulares aderidos (Figura 2C,D).

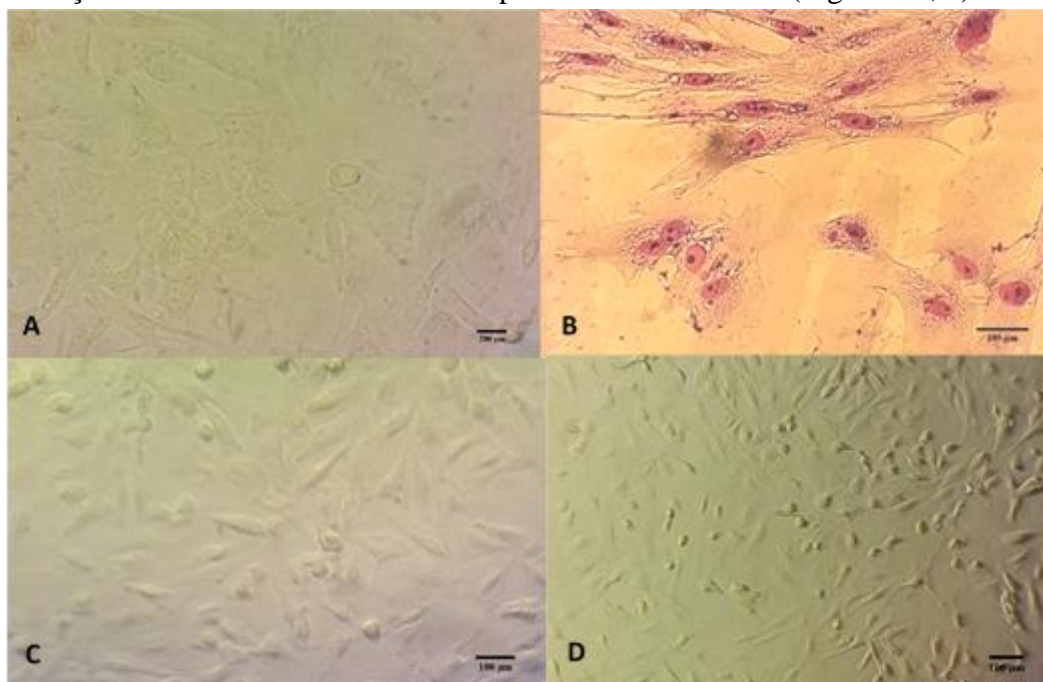


Figura 2. CPHCR-su em cultivo. (A) Morfologia epiteliode/fibroblastoide, percebe-se que as células são volumosas, aderentes ao plástico e umas às outras, P1 aos 5 dias. (B) Células com núcleo arredondado e elipsoide, com nucléolos evidentes e citoplasma com vacúolos, corante Giemsa, P1 aos 5 dias. (C) e (D) cultura homogênea em P2 aos 8 dias.

Ensaio de CFC-F e cinética celular

As CTMMO-su e CPHCR-su foram positivas ao ensaio de CFC-F formaram mais de 50 colônias bem definidas (Figura 3).

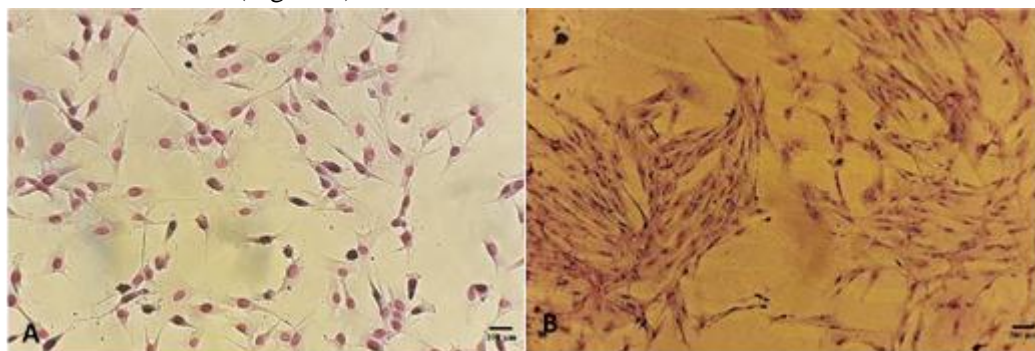


Figura 3. Ensaio de UFC-F, corante Giemsa. (A) CTMMO-su. (B) CPHCR-su.

Quanto à cinética celular, a curva de crescimento de CTMMO-su (Figura 4) foi feita em duplicata (C1 e C2). Não foi possível observar uma fase de latência (lag). Em P1, as culturas apresentaram a fase exponencial de crescimento, nesta fase log verificou-se adaptação e crescimento celular com sucessivas divisões mitóticas, as células mantiveram suas características normais e passaram de 10% de confluência para 80% em P8. Em P10, a cultura alcançou o seu exponencial máximo, quando então chegou a 100% de confluência. Em P13 a concentração celular ainda se apresentava maior que no início da

curva. A fase *plateau* da curva de crescimento foi demonstrada em apenas uma amostra, C2, de P14 a P16. Houve uma desaceleração da cultura com picos de crescimento celular, porém com viabilidade mantida acima de 50% até P19 nas duas amostras e acima de 70% em C2 até P22. Neste período, devido à alta quantidade de células, houve exaustão da cultura com esgotamento de nutrientes e dióxido de carbono, iniciando assim a fase de morte celular. A cultura apresentou viabilidade até P25 quando então chegou a 0% (Figura 4).

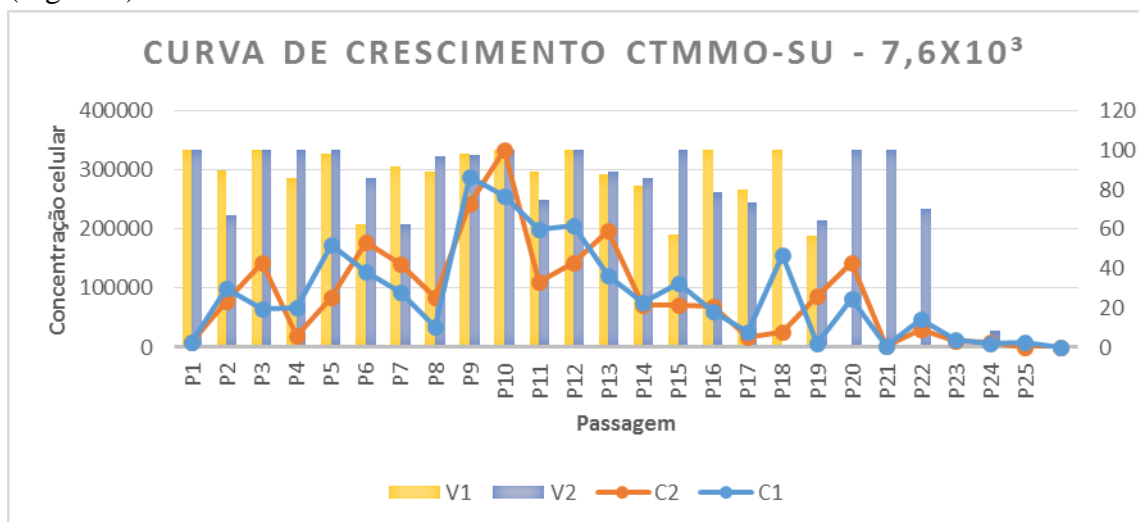


Figura 4. Curva de crescimento celular de CTMMO-su, em concentração inicial de $7,6 \times 10^3$ células.

A curva de crescimento de CPHCR-su demonstrou crescimento exponencial com maior concentração celular em P2, viabilidade de 100%, com rápida diminuição da quantidade de células em P4 e morte total da cultura em P5 (Figura 5).

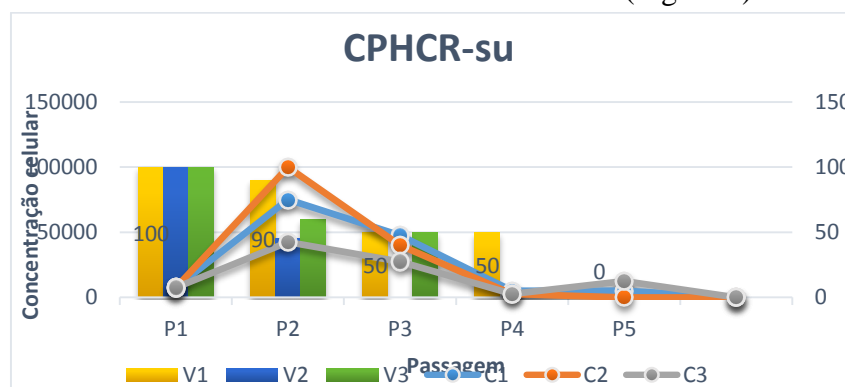


Figura 5. Curva de crescimento celular de CPHCR-su, em concentração inicial de $7,6 \times 10^3$ células.

Diferenciação celular

A indução da diferenciação (Figura 6) em adipócitos, condrócitos e osteócitos foi positiva para CTMMO-su, com modificação da morfologia celular e demonstrou coloração positiva para cada linhagem. As CPHCR-su em P2 e P4 (Figura 6), apresentaram diferenciação em condrócitos e osteócitos igualmente ao descrito para as CTMMO-su, porém, quando induzidas à diferenciação adipogênica demonstraram fraca positividade, ou seja, sua morfologia habitual foi modificada, alguns vacúolos lipídicos

foram corados com *oil red* (Figura 6 B e C), porém não demonstraram células planas e núcleos periféricos como foi visto nas CTMMO-su (Figura 6D).

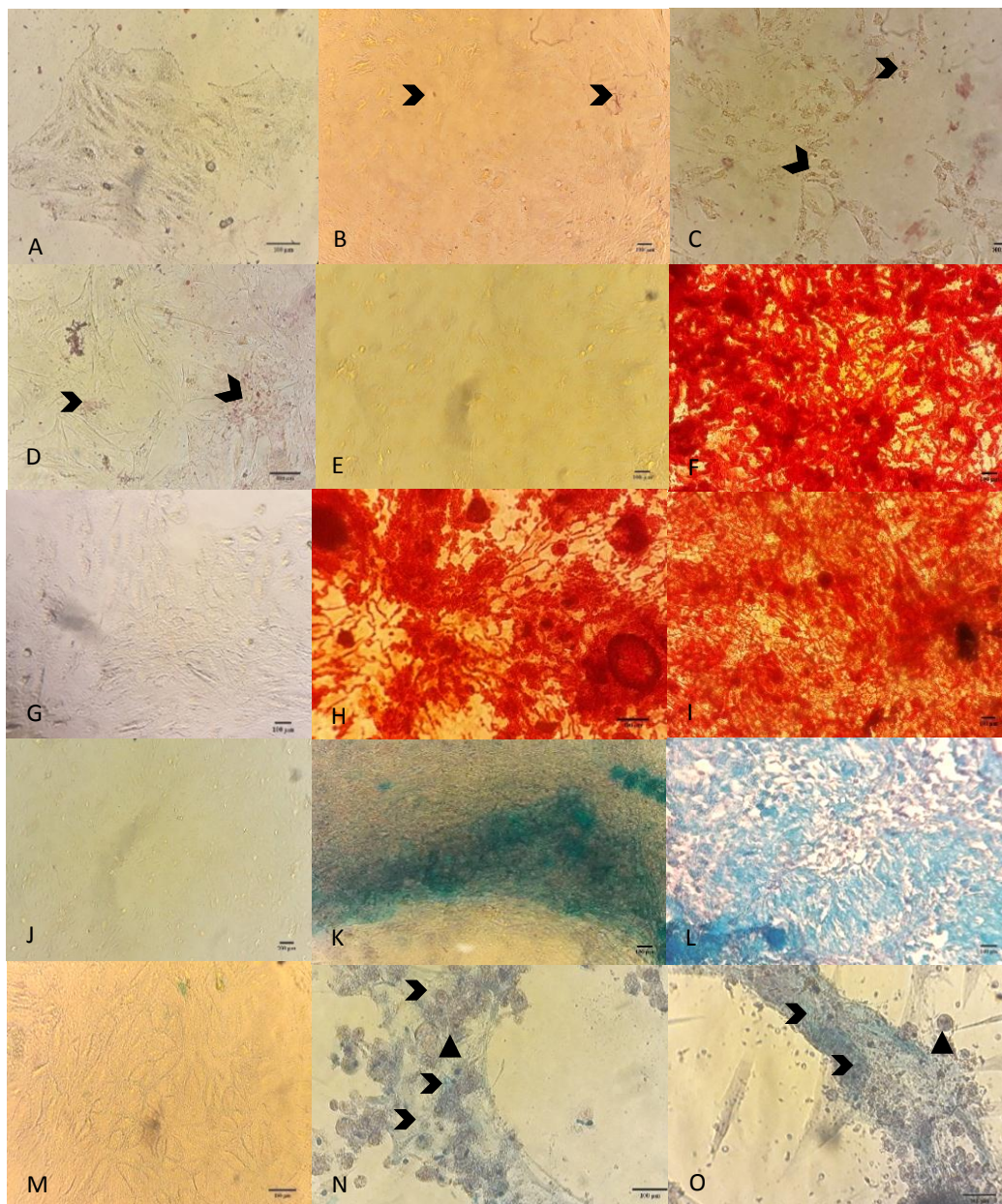


Figura 6. Ensaio de diferenciação celular. (A) controle adipogênico; (B e C) CPHCR-su em P2 e P4; (D) adipogênica CTMMO-su, vacúolos lipídicos no citoplasma corados com *Oil red* (cabeça de seta). (E e G) controle osteogênico CTMMO-su e CPHCR-su, respectivamente; (F, H, I) CTMMO-su, CPHCR-su em P2 e P4, com matriz óssea corada com *alizarin red*, respectivamente. (J, M) controle condrogênico CTMMO-su e CPHCR-su, respectivamente; (K, L, N, O) diferenciação condrogênica positiva de CTMMO-su, CPHCR-su em P2 e P4, proteoglicanos corados em azul por *Alcian blue*. (G, H e I).

Caracterização Imunofenotípica das CTMMO-su e CPHCR-su

As CTMMO-su caracterizadas por citometria de fluxo contínuo apresentaram-se CD14-/CD133-/CD105+/CD90+/CD140b+ (Figura 7, Tabela 1).

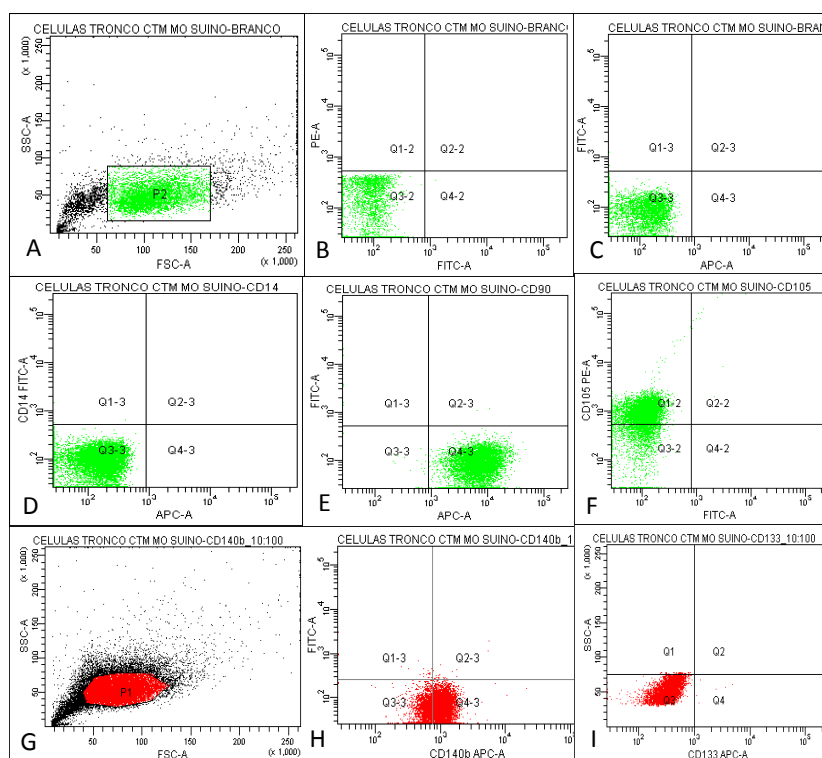


Figura 7. Análise da expressão de marcadores celular por citometria de fluxo. (A,B,C) Branco fluorocromos FITC, APC e PE; (D) CD14, FITC; (E) CD90, APC e (F) CD105, PE; (G) População de CTM; (H) CD140b, APC; e (I) CD133, APC.

As CPHCR-su foram analisadas em duas passagens (P2 e P4), devido à cinética celular ter apresentado redução da viabilidade celular em P4. A análise em citômetro de fluxo, demonstrou a presença de subpopulações, dentro da cultura (Tabela 1) (Figura 8G) com uma população maior (Pp1) que significava aproximadamente 62% e uma população menor (Pp2) representando 38% do total populacional (TP), com granulidade maior e tamanho menor que a Pp1.

Tabela 1. Expressão positiva para marcadores de superfície celular por citometria de fluxo.

Expressão positiva para marcadores de superfície celular por citometria de fluxo

Anticorpos	CTMMO-su (%)	CPHCR-su em P2 (%)	CPHCR-su em P4 (%)
CD14	TP (0)	Pp1 (0), Pp2 (0), TP (0)	Pp1 (0), Pp2 (0), TP (0)
CD105	TP (78)	Pp1 (0), Pp2 (0), TP (0)	Pp1 (0), Pp2 (0), TP (0)
CD90	TP (99)	Pp1 (86), Pp2 (0), TP (86)	Pp1 (25), Pp2 (0), TP (25)
CD140b	TP (76)	Pp1 (62), Pp2 (92), TP (79)	Pp1 (1), Pp2 (0), TP (0)
CD133	TP (0)	Pp1 (1,45), Pp2 (18), TP (9)	Pp1 (0), Pp2 (0), TP (0)

Pp1: População maior; Pp2: população menor; TP: total populacional.

Em P2, demonstraram-se CD14-/CD105-/CD90+/CD140b+/CD133+(Figura 8D-I) (Tabela 1). E em P4, foram e em P4, CD14-/CD105-/CD90+/CD133-/CD140b- notou-se uma redução da expressão dos marcadores celulares para CD90+ (25%), CD 133+ (0%) e CD140b+(0%) (Figura 8 J-O) (Tabela 1).

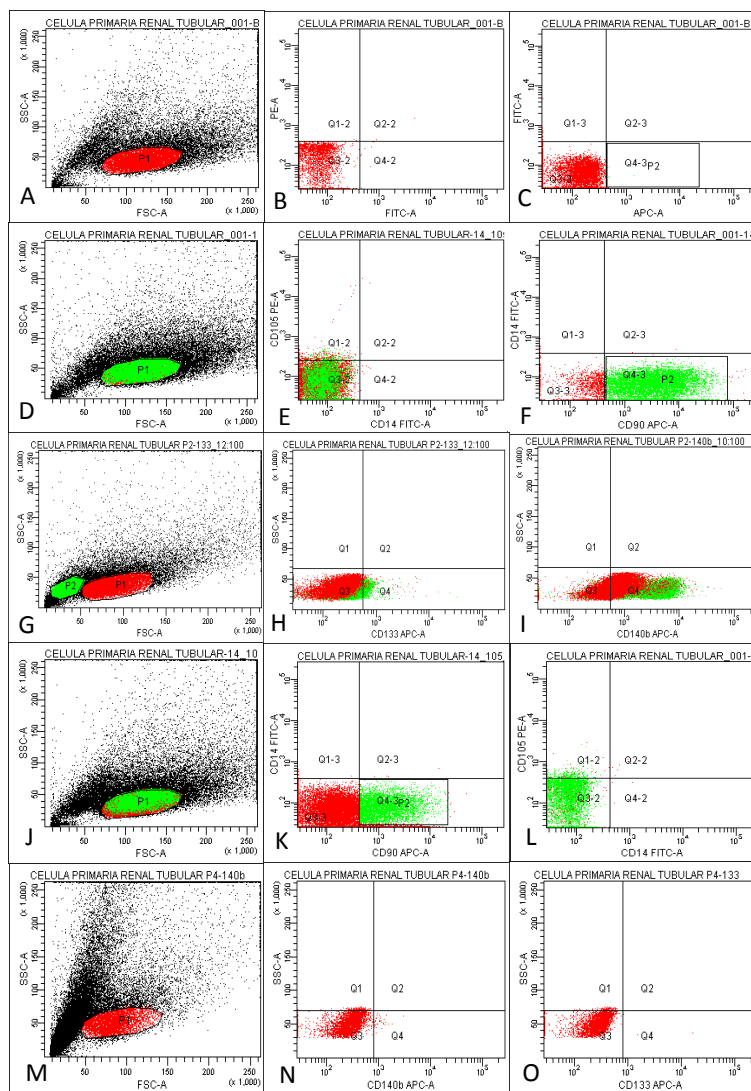


Figura 8. Análise da expressão de marcadores celular por citometria de fluxo das CPHCR-su. (A,B,C) Branco (sem marcação por anticorpos), fluorocromos: FITC, APC e PE; (D e G) CPHCR-su em P2: (E) CD14 (FITC); (F) CD90 (APC) e CD105 (PE); (H) CD133 (APC); (I) CD140b (APC). (J e M) CPHCR-su em P4: (K) CD90 (APC) e CD105 (PE); (L) CD14 (FITC); (N) CD140b (APC); (O) CD133 (APC).

Discussão

A morfologia de CTMMO-su em cultivo foi semelhante à CTM de diversas pesquisas contemporâneas realizadas a partir do isolamento de medula óssea, de outros sítios de coleta e em outras espécies animais [9,11–13]. Do mesmo modo, o ensaio de UFC-F, demonstrou o sucesso do isolamento. As CPHCR-su apresentaram comportamento *in vitro* semelhante ao descrito em estudos de isolamento para células primárias renais tubulares [3,10]. Em relação à curva de crescimento e morte celular em P5 de CPHCR-su, nosso estudo corrobora com Qi et al. [3] que afirmam em culturas primárias de túbulos proximais, estas não podem ser propagadas por mais de quatro passagens.

O ensaio de caracterização celular *in vitro* permitiu a identificação de uma população de células progenitoras renais CD133+ CD105- bem delimitada, diametralmente à população de células progenitoras de medula óssea CD133- CD105+, amplamente aceita como tronco

mesenquimal pela literatura científica contemporânea [9,14–16]. Estudos com células progenitoras renais humanas relataram mesmo comportamento CD105-[17], assim como em CTM podendo estas apresentarem expressão ou não para endoglin, as CTM CD105- foram mais propensas a diferenciar-se em adipócitos e osteócitos e suprimiram a proliferação de células T CD4 (+) com mais eficácia em comparação com as CD105+ [18].

Divergências existem sobre a caracterização da natureza das células progenitoras renais identificadas, haja visto que, há extensa informação científica recente classificando-as genericamente como progenitoras [2,19–21]. Neste aspecto, as células progenitoras identificadas poderiam ser oriundas de células renais CD133+ CD24+ bipotentes, comprometidos com podócitos ou progenitores tubulares, com base na expressão superficial de mAb anti-podocalyxin (PDX) ou CD106[1].

Neste estudo, as amostras de tecido utilizadas para isolamento celular foram obtidas de córtex renal, as quais, após tratamento enzimático, foram filtradas em 120 micrômetros, limite este abaixo do tamanho médio de glomérulos suínos (150 a 200 micrômetros) [22,23]. Desta forma, poderiam permanecer na amostra, progenitores tubulares e/ou de podócitos, ambos CD133+[1], assim como tronco/progenitoras CD133+CD105-[16,24], não sendo objetivo deste estudo, diferencia-los entre si.

De forma análoga, a caracterização dos principais marcadores para células-tronco mesenquimais e progenitores renais de suínos identificados, corresponderam às descrições literárias prévias [2,15–18]. As tronco mesenquimais e progenitoras renais, em cultivo, comportaram-se como CD14-, CD90+, o que segundo estudos recentes [25–30], permitem inferir que tais células não pertencem à linhagem hematopoiética e enquadram-se em uma superfamília de células que expressam moléculas semelhantes a imunoglobulinas, presentes desde células-tronco à processos axonais de neurônios maduros, respectivamente.

Contudo, como as células-tronco mesenquimais estão presentes, virtualmente, em todos os tecidos pós natais [5], assume-se o silogismo que o córtex renal pode ser um sítio para isolamento destas células. Estudos contemporâneos já demonstraram o isolamento de células-tronco mesenquimais do parênquima renal de ratos e humanos, utilizando o protocolo convencional de explante com tratamento enzimático [3,17,19,20,25,31], tal qual adotado na metodologia do presente estudo. Para esclarecer esta relevante questão, utilizou-se o marcador 140b, específico para tronco mesenquimais e pericitos. Surpreendentemente, a população de progenitoras renais comportaram-se como 140b+ em cultivo. Tal resultado corrobora ao observado em estudo de células endometriais [32,33]. Estes autores denominaram genericamente estas células como “tronco/progenitoras”, embora outros estudos também indiquem resultados semelhantes [24,34].

Tal observação evidencia a dificuldade científica atual em diferenciar categórica e indubitavelmente as populações de células-tronco, células progenitoras e células indiferenciadas, utilizadas como sinônimos genéricos em estudos moleculares [2,14,19,21,26,35]. Neste contexto, deve-se compreender que, etimologicamente, progenitora é toda célula ancestral à linhagem posterior, portanto, indiferenciada. Algumas células progenitoras/indiferenciadas possuem potencial totipotente ou pluripotente, se de origem embrionária ou pluripotente, oligopotente ou onipotente, se de origem somática[36]. Independente da plasticidade celular, serão categorizadas no grande e heterogêneo grupo de células progenitoras/indiferenciadas (Figura 9).

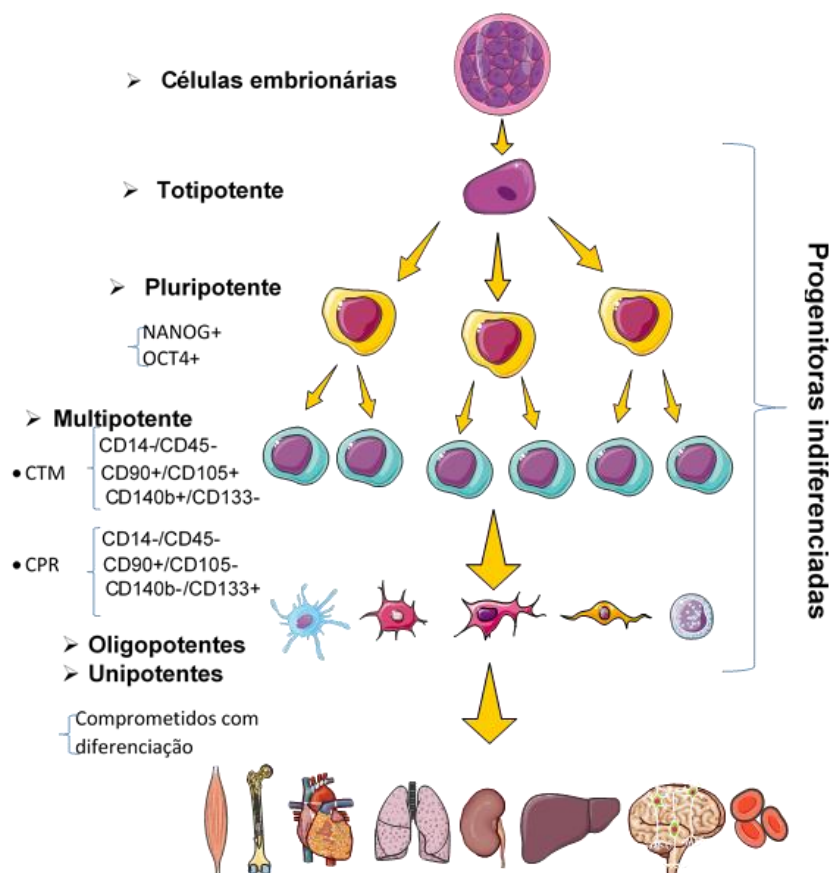


Figura 9. Caracterização e classificação das células progenitoras. As células embrionárias dão origem à células totipotentes que se replicam em células com capacidade de se transformar em diversos tipos celulares e positivas para marcadores de pluiipotência. Estas células dão origem a células multipotentes que possuem maior restrição de plasticidade que as suas ancestrais, essas células expressam marcadores de superfície específicos, nesta categoria, se enquadram as células-tronco mesenquimais (CTM) e células progenitoras heterogêneas do córtex renal (CPR). Por sua plasticidade podem se transformar em diversos tipos celulares conforme a sinalização célula-célula *in vitro* e *in vivo* dando origem a células com menor potencial de diferenciação, oligopotentes ou unipotentes que são comprometidos com a reparação e regeneração específica para cada órgão destinado.

Como descrito anteriormente, neste estudo, tanto as culturas de tronco mesenquimais, quanto progenitoras, apresentaram diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica positiva no ensaio de plasticidade. Estes achados estão de acordo com inferências prévias que apresentam as progenitoras renais com plasticidade similar as tronco mesenquimais [2,16,26,37,38]. Este resultado, quando analisado em conjunto com o ensaio de caracterização celular, permite-nos propor o agrupamento das tronco mesenquimais medulares e progenitoras renais, no grande grupo de células multipotentes e, portanto, de destacado interesse para estudos com terapia celular.

A dificuldade em caracterizar precisamente a natureza da população estudada, consiste no amplo perfil de marcadores moleculares que deveriam ser utilizados para maximizar a análise da expressão dos mesmos. Não obstante, ainda que seja assumido um perfil extenso de marcadores moleculares para diferenciação das populações celulares entre si, como a célula em cultivo representa uma simulação de sua provável ou possível expressão *in vivo*, não se pode desconsiderar que, sob estímulos específicos, haja sobreposição de características entre populações distintas ou que estas representem a mesma população celular com expressão

diferenciada. Exemplos que sustentam tais possibilidades estão representados na identificação errônea das células MAPC como uma subpopulação de células-tronco [39] e na hipótese, cada vez mais discutida, que as células-tronco mesenquimais sejam pericitos ativados, os quais assumem características específicas em cultivo [6,40].

Ressalta-se que o meio de cultivo utilizado para as células progenitoras heterogêneas do córtex renal neste estudo foi diluído em meio de crescimento de ceratinócito suplementado com extrato de pituitária bovina e fator de crescimento epiderme humano, conforme indicado na literatura especializada [3,25] e, portanto, não específico para tronco mesenquimais.

A possibilidade de permanência de CTM em meio de cultivo específico para progenitores renais leva-nos a questionar a especificidade dos meios indicados para cultivo de tronco mesenquimais e, até mesmo, se não poderiam se tratar do mesmo grupo celular.

Embora a caracterização e, conseqüentemente, a determinação da natureza celular seja de grande relevância para a compreensão de sua expressão proteica e comportamento, para a finalidade de terapia celular, mais relevante torna-se a determinação da plasticidade do grupo celular isolado. Desta forma, comprovou-se, com relativa segurança, que as progenitoras isoladas do córtex renal suíno são multipotentes, com expressão similar as tronco mesenquimais medulares. É salutar destacar a importância de estudos posteriores que determinem a genômica desta população multipotente, para corroborar ou questionar os resultados ora apresentados. Infere-se que o nicho cortical renal em suínos representa importante fonte de células progenitoras multipotentes com potencial para ensaios pré-clínicos.

Referências

- [1] M.L. Angelotti, E. Ronconi, L. Ballerini, A. Peired, B. Mazzinghi, C. Sagrinati, E. Parente, M. Gacci, M. Carini, M. Rotondi, A.B. Fogo, E. Lazzeri, L. Lasagni, P. Romagnani, Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury, *Stem Cells*. 30 (2012) 1714–1725. doi:10.1002/stem.1130.
- [2] D. Lindgren, A.-K. Boström, K. Nilsson, J. Hansson, J. Sjölund, C. Möller, K. Jirström, E. Nilsson, G. Landberg, H. Axelson, M.E. Johansson, Isolation and Characterization of Progenitor-Like Cells from Human Renal Proximal Tubules, *Am. J. Pathol.* 178 (2011) 828–837. doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.026.
- [3] W. Qi, D.W. Johnson, D.A. Vesey, C.A. Pollock, X. Chen, Isolation, propagation and characterization of primary tubule cell culture from human kidney (Methods in Renal Research), *Nephrology*. 12 (2007) 155–159. doi:10.1111/j.1440-1797.2007.00779.x.
- [4] A. Maeshima, S. Yamashita, Y. Nojima, Identification of Renal Progenitor-Like Tubular Cells that Participate in the Regeneration Processes of the Kidney, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (2003) 3138–3146. doi:10.1097/01.ASN.0000098685.43700.28.
- [5] L. da Silva Meirelles, Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 2204–2213. doi:10.1242/jcs.02932.
- [6] L. da Silva Meirelles, T.M. Malta, V.M. de Deus Wagatsuma, P.V.B. Palma, A.G. Araújo, K.C. Ribeiro Malmegrim, F. Morato de Oliveira, R.A. Panepucci, W.A. Silva, S. Kashima Haddad, D.T. Covas, Cultured Human Adipose Tissue Pericytes and Mesenchymal Stromal Cells Display a Very Similar Gene Expression Profile, *Stem Cells Dev.* 24 (2015) 2822–2840. doi:10.1089/scd.2015.0153.
- [7] R. Wernersson, M.H. Schierup, F.G. Jørgensen, J. Gorodkin, F. Panitz, H.H. Stærfeldt, O.F. Christensen, T. Mailund, H. Hornshøj, A. Klein, J. Wang, B. Liu, S. Hu, W. Dong, W. Li, G.K.S. Wong, J. Yu, J. Wang, C. Bendixen, M. Fredholm, S. Brunak, H. Yang, L. Bolund, Pigs in sequence space: A 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing, *BMC Genomics*. 6 (2005) 1–7. doi:10.1186/1471-2164-6-70.
- [8] F. Grønlund Jørgensen, A. Hobolth, H. Hornshøj, C. Bendixen, M. Fredholm, M.H. Schierup, Comparative analysis of protein coding sequences from human, mouse and the domesticated pig, *BMC Biol.* 3 (2005) 1–15. doi:10.1186/1741-7007-3-2.
- [9] N.M.A. Neto, M.L.T. Feitosa, S.S. Sousa, P.B. Fernandes, G.T. Pessoa, D. de Oliveira Bezerra, H.M. de Almeida, Y.K.P. de Carvalho, A.R. da Rocha, L.M.C. Silva, M.A.M. de Carvalho, Isolation,

- expansion, differentiation and growth kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*), *Acta Sci. Vet.* 44 (2016) 1–11.
- [10] L.M. Yamaleyeva, N.K. Guimaraes-Souza, L.S. Krane, S. Agcaoili, K. Gyabaah, A. Atala, T. Aboushwareb, J.J. Yoo, Cell therapy with human renal cell cultures containing erythropoietin-positive cells improves chronic kidney injury., *Stem Cells Transl. Med.* 1 (2012) 373–83. doi:10.5966/sctm.2011-0048.
- [11] C.R.M. Costa, M.L.T. Feitosa, D.O. Bezerra, Y.K.P. Carvalho, R.F.G. Olivindo, P.B. Fernando, G.C. Silva, M.L.G. Silva, C.E. Ambrósio, A.M. Conde Júnior, N.M. Argolo Neto, L.M. Costa Silva, M.A.M. Carvalho, Labeling of adipose-derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent signal for ex vivo cell tracking, *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 53 (2017) 363–370. doi:10.1007/s11626-016-0121-2.
- [12] G.T. Pessoa, M.L.T. Feitosa, N.M.A. Neto, A.R. Da Rocha, C.R. De Moraes Da Costa, G.C. Da Silva, D. De Oliveira Bezerra, C.J. Da Costa Coelho, S.S. Sousa, M.A.M. De Carvalho, Isolation, culture and differentiation potential of collared peccary (*Tayassu tajacu*) adipose-derived stem cells, *Acta Sci. Vet.* 42 (2014).
- [13] M.A. de C. Rocha, L.M.C. Silva, W.A. de Oliveira, D. de O. Bezerra, G.C. da Silva, L. dos S. Silva, B.L. do N. Medeiros, S. de A.F. Baêta, M.A.M. de Carvalho, N.M. Argôlo Neto, M.A. de C. Rocha, L.M.C. Silva, W.A. de Oliveira, D. de O. Bezerra, G.C. da Silva, L. dos S. Silva, B.L. do N. Medeiros, S. de A.F. Baêta, M.A.M. de Carvalho, N.M. Argôlo Neto, Allogeneic mesenchymal stem cells and xenogenic platelet rich plasma, associated or not, in the repair of bone failures in rabbits with secondary osteoporosis, *Acta Cir. Bras.* 32 (2017) 767–780. doi:10.1590/s0102-865020170090000009.
- [14] P. Bourin, B.A. Bunnell, L. Casteilla, M. Dominici, A.J. Katz, K.L. March, H. Redl, J.P. Rubin, K. Yoshimura, J.M. Gimble, Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society of Cytotherapy. 15 (2013) 641–648. doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.006.
- [15] L. Zhang, Y. Wang, J. Ma, X. Lai, J. Fang, G. Li, L. Xu, G. Pan, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate ischemia-reperfusion injury of rat renal tubular epithelial cells through expression of HGF, 9 (2016) 6007–6014.
- [16] B. Bakondi, I.S. Shimada, A. Perry, J.R. Munoz, J. Ylostalo, A.B. Howard, C.A. Gregory, J.L. Spees, CD133 Identifies a Human Bone Marrow Stem / Progenitor Cell Sub-population With a Repertoire of Secreted Factors That Protect Against Stroke, *YMTHE.* 17 (2009) 1938–1947. doi:10.1038/mt.2009.185.
- [17] C. Grange, A. Moggio, M. Tapparo, S. Porta, G. Camussi, B. Bussolati, Protective effect and localization by optical imaging of human renal CD133+ progenitor cells in an acute kidney injury model., *Physiol. Rep.* 2 (2014) e12009. doi:10.14814/phy2.12009.
- [18] P. Anderson, A.B. Carrillo-Gálvez, A. García-Pérez, M. Cobo, F. Martín, CD105 (Endoglin)-Negative Murine Mesenchymal Stromal Cells Define a New Multipotent Subpopulation with Distinct Differentiation and Immunomodulatory Capacities, *PLoS One.* 8 (2013) 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0076979.
- [19] B. Bussolati, G. Camussi, Therapeutic use of human renal progenitor cells for kidney regeneration, *Nat. Rev. Nephrol.* 11 (2015) 695–706. doi:10.1038/nrneph.2015.126.
- [20] S. Aggarwal, C. Grange, C. Iampietro, G. Camussi, B. Bussolati, Human CD133 + Renal Progenitor Cells Induce Erythropoietin Production and Limit Fibrosis after Acute Tubular Injury, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–13. doi:10.1038/srep37270.
- [21] B. Bussolati, S. Bruno, C. Grange, S. Buttiglieri, M.C. Deregibus, D. Cantino, G. Camussi, Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney, *Am. J. Pathol.* 166 (2005) 545–555. doi:10.1016/S0002-9440(10)62276-6.
- [22] C. Friis, Postnatal development of the pig kidney: Ultrastructure of the glomerulus and the proximal tubule, *J. Anat.* 130 (1980) 513–526.
- [23] M. Figliuzzi, G. Remuzzi, A. Remuzzi, Renal bioengineering with scaffolds generated from rat and pig kidneys., *Nephron. Exp. Nephrol.* 126 (2014) 113. doi:10.1159/000360683.
- [24] F. Sallustio, V. Costantino, S.N. Cox, A. Loverre, C. Divella, M. Rizzi, F.P. Schena, Human renal stem/progenitor cells repair tubular epithelial cell injury through TLR2-driven inhibin-A and microvesicle-shuttled decorin, *Kidney Int.* 83 (2013) 392–403. doi:10.1038/ki.2012.413.
- [25] L. Yamaleyeva, N. Guimaraes-Souza, L. Krane, S. Agcaoili, K. Gyabaah, A. Atala, T. Aboushwareb,

- J. Yoo, Cell Therapy with Human Renal Cell Cultures Containing Erythropoietin-Positive Cells Improves Chronic Kidney Injury, *Stem Cells Transl. Med.* 1 (2012) 373–383. doi:10.5966/sctm.2011-0048.
- [26] Y.K.P. de Carvalho, N.M. Argôlo-Neto, C.E. Ambrósio, L. de J. de Oliveira, A.R. da Rocha, J.B. da Silva, M.A.M. de Carvalho, F.R. Alves, Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta Prymnolopha* Wagler, 1831), *Pesqui. Vet. Bras.* 35 (2015) 590–598. doi:10.1590/S0100-736X2015000600018.
- [27] P. Kasten, I. Beyen, M. Egermann, a J. Suda, a a Moghaddam, G. Zimmermann, R. Luginbühl, Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro., *Eur. Cell. Mater.* 16 (2008) 47–55. doi:10.22203/eCM.v016a06.
- [28] S. Gupta, C. Verfaillie, D. Chmielewski, S. Kren, K. Eidman, J. Connaire, Y. Heremans, T. Lund, M. Blackstad, Y. Jiang, A. Luttun, M.E. Rosenberg, Isolation and Characterization of Kidney-Derived Stem Cells, *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 (2006) 3028–3040. doi:10.1681/ASN.2006030275.
- [29] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C. Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, E.M. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy.* 8 (2006) 315–317. doi:10.1080/14653240600855905.
- [30] L. Kisselbach, M. Merges, A. Bossie, A. Boyd, CD90 expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures, *Cytotechnology.* 59 (2009) 31–44. doi:10.1007/s10616-009-9190-3.
- [31] A. Ranghino, S. Bruno, B. Bussolati, A. Moggio, V. Dimuccio, M. Tapparo, L. Biancone, P. Gontero, B. Frea, G. Camussi, The effects of glomerular and tubular renal progenitors and derived extracellular vesicles on recovery from acute kidney injury, *Stem Cell Res. Ther.* 8 (2017) 1–15. doi:10.1186/s13287-017-0478-5.
- [32] F.L. Cousins, F.O. Dorien, C.E. Gargett, Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology Endometrial stem / progenitor cells and their role in the pathogenesis of endometriosis, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* (2018) 1–12. doi:10.1016/j.bpobgyn.2018.01.011.
- [33] J.W.M. Niedziela, A.P.K. Wartalski, B.G.Z. Smorąg, Z.R.J. Karasiński, Identification of perivascular and stromal mesenchymal stem / progenitor cells in porcine endometrium, (2017) 333–343. doi:10.1111/rda.13109.
- [34] A. Klimczak, U. Kozłowska, M. Kurpisz, Muscle Stem/Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells of Bone Marrow Origin for Skeletal Muscle Regeneration in Muscular Dystrophies, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 0 (2018) 1–14. doi:10.1007/s00005-018-0509-7.
- [35] K. Miyazaki, T. Maruyama, H. Masuda, A. Yamasaki, S. Uchida, H. Oda, H. Uchida, Y. Yoshimura, Stem Cell-Like Differentiation Potentials of Endometrial Side Population Cells as Revealed by a Newly Developed In Vivo Endometrial Stem Cell Assay, *PLoS One.* 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0050749.
- [36] R.M. Seaberg, D. Van Der Kooy, Stem and progenitor cells: The premature desertion of rigorous definitions, *Trends Neurosci.* 26 (2003) 125–131. doi:10.1016/S0166-2236(03)00031-6.
- [37] R.E. Schwartz, W. Hu, M. Catherine, R.E. Schwartz, M. Reyes, L. Koodie, Y. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, T. Lenvik, S. Johnson, W. Hu, C.M. Verfaillie, Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte- like cells Find the latest version : Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells, (2002). doi:10.1172/JCI200215182.Introduction.
- [38] M. Beerens, X.L. Aranguren, B. Hendrickx, W. Dheedene, Multipotent Adult Progenitor Cells Support Lymphatic Regeneration at Multiple Anatomical Levels during Wound Healing and Lymphedema, *Sci. Rep.* (2018) 1–14. doi:10.1038/s41598-018-21610-8.
- [39] M. Reyes, C.M. Verfaillie, Characterization of Multipotent Adult Progenitor Cells , a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells, (n.d.) 231–235.
- [40] S. Wong, J.E. Rowley, A.N. Redpath, J.D. Tilman, T.G. Fellous, J.R. Johnson, Pharmacology & Therapeutics Pericytes , mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair, *Pharmacol. Ther.* 151 (2015) 107–120. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.03.006.

CAPÍTULO II*

*Manuscrito redigido conforme as normas do periódico *Plos One*

Efeito renoprotetor entre células progenitoras heterogêneas do córtex renal de suínos e tronco mesenquimais medulares em lesões de isquemia-reperfusão em suínos

Dayseanny de Oliveira Bezerra^I

Maria Acelina Martins de Carvalho^{II}

^I Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Brasil

^{II} Professora, Doutora, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Brasil.

Resumo

A insuficiência renal aguda é a perda súbita da função renal e pode levar à morte, uma das causas que levam a esta condição consiste na síndrome de isquemia/ reperfusão renal, comum em doenças arteriais e transplante renal. Possui como característica a necrose tubular aguda durante a isquemia e na reoxigenação celular é caracterizada pelo aumento na peroxidação lipídica, no dano celular e na redução da função de filtração e excreção renal. O objetivo deste estudo foi analisar o potencial terapêutico das células progenitoras heterogêneas do córtex renal (CPHCR-su) comparando às células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMMO-su) na síndrome de isquemia/reperfusão renal. Foram utilizados 15 suínos machos, sadios, com idade entre 60 a 70 dias, divididos em três grupos de cinco animais (GC – Controle, G1- tratamento com CTMMO-su e G2 - tratamento com CPHCR-su), os quais foram submetidos à nefropatia por modelo de isquemia total bilateral durante uma hora, seguido de reperfusão sanguínea. As CTMMO-su caracterizadas como CD14-/CD133-/CD105+/CD90+/CD140b+ e as CPHCR-su, CD14-/CD105-/CD90+/CD140b+/CD133 foram marcadas com nanocristais fluorescentes (Q-tracker®). Nos animais do GC, foi aplicado 1mL de solução fisiológica, via local; G1, CTMMO-su (1×10^6 /animal); e no G2, CPHCR-su (1×10^6 /animal). Os animais foram avaliados por meio de ultrassonografia renal, urinálise, bioquímica sérica e análise de citocinas, antes e após infusão celular; e realizada análise histopatológica após quatro e oito dias do tratamento. Os resultados foram submetidos à análise estatística com dados paramétricos em parcela subdividida e comparação de médias por teste F e dados não paramétricos por teste Kruskal-Wallis a 5% de significância. As análises histopatológicas demonstraram diferenças estatísticas significativas, para as variáveis de degeneração tubular, necrose/apoptose tubular e ectasia tubular, com menor média para G2, comparado ao GC e G1, entretanto estes, não diferiram entre si ($p < 0,05$). Dessa forma, a terapia com CPHCR-su possibilitou marcante redução das lesões IRR de degeneração vacuolar, necrose e ectasia tubular, quando comparadas ao tratamento com CTMMO-su, sugerindo maior efeito renoprotetor da primeira em detrimento desta última.

Endereço para correspondência: Maria Acelina M. Carvalho, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, CEP 64049-550, Teresina – PI, Brasil.
Email: mcelina@ufpi.edu.br

Introdução

A injúria de isquemia reperfusão renal (IRR) é uma síndrome complexa que envolve a resposta celular, fatores imunológicos e moleculares. O processo se inicia com a interrupção abrupta de sangue no rim, causando diminuição da oxigenação celular o que leva, por um período prolongado, danos teciduais como necrose tubular aguda (NTA), ectasia, lesões glomerulares e intersticiais (1–3). Em seguida, há a reperfusão sanguínea, que induz a liberação de espécies reativas de oxigênio, radicais livres que agem nos ácidos nucleicos e nas membranas celulares, danificando-as por meio da peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados que resultam na formação de hidróxiperoxídeos inibindo assim processos enzimáticos e levando a célula à morte (4). Esta injúria está presente na isquemia quente e fria em transplantes renais, sendo uma importante causa para a lesão renal aguda e para a diminuição da sobrevida do órgão transplantado (3).

Estudos sobre o mecanismo fisiopatológico da IRR demonstram que durante a lesão, a infiltração de células mieloides é proporcional a rápida perda de células epiteliais EpCAM + e ao momento da produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-10. Uma redução substancial no número de monócitos inflamatórios e neutrófilos em três dias pós-lesão, destaca o período curto da janela terapêutica para direcionar essas células para benefício da terapia (5).

Estratégias para reduzir os efeitos da IRR vêm sendo trabalhadas no campo da terapia celular, sobre o efeito da administração de células hematopoiéticas (6). Células-tronco mesenquimais (CTM), demonstraram efeitos benéficos de imunomodulação, redução da NTA (7–10), porém, acreditam-se que o efeito reparador acontece por mecanismos parácrinos de sinalização para evitar processos inflamatórios e morte celular, diferentemente da ação regenerativa observada pelas células progenitoras renais (CPR).

Consideradas tronco-renal, as CPR promovem a melhoria da função renal e tecidual em lesão de IRR (11–14). Resultados semelhantes foram demonstrados com o uso de células primárias renais tubulares na lesão crônica em modelo murino (15). Entretanto, no que diz respeito a LRA e em modelo animal suíno, nota-se uma carência nas pesquisas, principalmente, relativas à comparação da terapia utilizando CTM e CPR, que podem elucidar melhora clínica e tecidual, e até mesmo representar estratégias alternativas eficazes para diminuição da lesão de IRR na medicina humana.

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de células-tronco mesenquimais da medula óssea de suínos (CTMMO-su) comparada à células progenitoras heterogêneas do córtex renal (CPHCR-su) na síndrome de isquemia/reperfusão renal.

Metodologia

Animais e Delineamento experimental

Foram utilizados 15 suínos machos saudáveis, com idade entre 60 e 70 dias, provenientes do criatório de suínos do setor de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí (UFPI) alimentados com ração para suínos em fase inicial e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em 03 grupos de 05 suínos, constituindo um grupo controle (GC) e dois grupos experimentais (G1 e G2). Todos os animais foram submetidos à indução da nefropatia por modelo isquemia total bilateral durante 01 hora, seguido de reperfusão sanguínea. Nos suínos do GC, foi aplicado 1mL de solução fisiológica, via local; nos animais do G1, CTMMO-su na dose de 1×10^6 /animal e G2, CPHCR-su isoladas a partir do córtex renal, na dose de 1×10^6 /animal. Todos os protocolos utilizados foram aprovados no Comitê de Ética em Uso Animal CEUA/UFPI sob nº 269/16.

Procedimento anestésico-cirúrgico para indução da isquemia/reperfusão renal

O protocolo anestésico foi realizado por associação de Ketamina (15 mg/kg) e Midazolam (1 mg/kg) pela via intramuscular (IM). Os animais foram induzidos por propofol endovenoso (3mg/kg), intubados por sonda endotraqueal 6.0 e mantidos por Isoflurano diluído em O₂ a 100% e fluidoterapia com Solução de Ringer com Lactato por via endovenosa (EV) pela veia cefálica.

Para indução da lesão de isquemia/reperfusão, o pedículo renal foi dissecado para acesso e manipulação da artéria renal direita e esquerda simultaneamente, estas foram ocluídas totalmente por meio de pinças vasculares *bulldog* durante 60 minutos. Transcorridos o tempo de clampeamento do órgão, as pinças foram removidas concluindo o tempo de isquemia e iniciando a reperfusão sanguínea do órgão. Ao final do procedimento, as alças intestinais foram recolocadas na cavidade abdominal e realizada a celiorrafia, com mononylon 2-0, para aproximação subcutânea, fio Vicryl 2-0 e pele mononylon 2-0. A ferida cirúrgica foi tratada com pomada cicatrizante (Alantol®).

Para a terapia pós-cirúrgica foi utilizado antibiótico de amplo espectro Enrofloxacin (Enrotec®) 2,5mg/kg/dia, durante 5 dias IM, antiinflamatório Flunixin

Meglumine (Banamine®) 1,1mg/kg por 3 dias e analgesia com Dipirona sódica (Algivet®) 25mg/kg EV e Tramadol (Tramadon®) 2 mg/kg IM durante 3 dias.

Os fragmentos de tecido renal foram coletados por meio de biópsia percutânea com o uso de agulha ajustável de biópsia (Super-Core™ II, 16ga x 15cm) e aparelho de ultrassonografia para as análises *in situ* das lesões teciduais. As coletas foram realizadas 04 e 08 dias após a cirurgia de indução de isquemia/reperfusão.

Descongelamento e Marcação celular

Foram utilizadas células existentes no banco de células do Laboratório de Cultivo de Células-tronco (LABCELT) do NUPCelt/UFPI. Para a terapia celular, CTMMO-su CD14-/CD105+/CD90+/CD140b+ (passagem 5) e CPHCR-su CD14-/CD105-/CD140b-/CD90+/CD133+ (passagem 2). Estas células, foram descongeladas, contadas, realizados estudos sobre a viabilidade e aderência em placa de cultivo, e marcadas após atestadas as condições viáveis para infusão. O método de marcação intracitoplasmática com nanocristais (*Q-Tracker® 655 Cell Labeling Kit*) foi realizado segundo protocolo descrito (16) e avaliados por microscópio de fluorescência (modelo BX41 OLYMPUS). Após esse procedimento, o *pellet* foi ressuspensionado em 2 mL de solução fisiológica e colocado em seringa contendo 1ml e aplicado em cinco pontos distribuídos aleatoriamente no parênquima renal.

Avaliação da resposta clínico-laboratorial e tecidual da terapia celular para a LRA

A avaliação dos animais foi realizada por urinálise antes da indução da IRR (0h) e 1h, 24h, 48h, 72, 96h, 144h e 192h após o tratamento. A obtenção de 10 mL de urina, por cistocentese, foi guiada por ultrassonografia, para análise dos seus aspectos físicos, químicos e de sedimento. Também, foi determinada a relação proteína urinária/creatinina urinária (PU/CU) e atividade da gama globulina-transpeptidase (GGT) urinária, consistindo em exames mais sensíveis para detectar lesão tubular aguda auxiliando à urinálise de rotina.

A avaliação da morfologia e morfometria renal foi feita por Ultrassonografia (Mindray, model: DP2200Vet, microconvex transducer 6.5MHz) antes da indução da lesão e 24h, 48h, 72h, 96h, 144h e 192h após.

Avaliação de citocinas por ensaio de imun absorção enzimática (ELISA)

Os níveis séricos de IL-4, IL-10 (anti-inflamatórias) e TNF- α (pró-inflamatória) dos suínos foram dosados utilizando kits comerciais de ELISA (R&D Systems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A densidade óptica foi medida a 450nm (Modelo LMR 96 – Loccus Brasil).

Avaliação Histopatológica e Rastreamento celular

A biópsia renal, guiada por US, foi realizada nos dias 04 e 08 após o tratamento. Fragmentos do córtex e da medula renal foram avaliados histopatológica e rastreamento dos nanocristais fluorescentes (Q-tracker®) das CTMMO-su e CPHCR-su. Esses fragmentos foram fixados em solução de formalina a 10% tamponado por 24 horas, processados histopatologicamente em protocolo convencional e incluídos em parafina, preparados cortes de 5µm de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina. As lâminas foram confeccionadas e analisadas por microscopia óptica de luz, para avaliação das possíveis alterações patológicas do rim. Para o rastreamento das CTMMO-su e CPHCR-su os fragmentos foram submetidos ao mesmo protocolo de processamento do exame histopatológico, porém sem uso da coloração, analisada por microscopia de fluorescência e fotomicrografada.

Análises estatísticas

A análise dos dados paramétricos da urinálise e bioquímica urinária foi realizada em um delineamento em blocos casualizados (DBC), em parcelas subdivididas e comparação de médias por teste de F a 5% de significância. Para análise ultrassonográfica da morfologia renal, todos os animais foram avaliados por observador às cegas e pontuados com escore 1 para cada lesão encontrada, dentre as cinco alterações características da lesão renal aguda: modificação do formato renal, mudança de ecogenicidade, dilatação piramidal, perda ou alteração da relação córtico/medular e edema renal. Após a quantificação das lesões, foi feita a média dos animais por grupo e grau de severidade, considerando 0 a 0,5 ausente; 0,6 a 1,5 leve; 1,6 a 3,5 = moderado; 3,6 a 5 severo. A análise estatística de citocinas foi realizada por ANOVA Two-way e pós-teste de Fischer-Bonferroni a 5% de significância, entre os grupos e entre os tempos dentro de cada grupo avaliado.

Para respostas do exame histopatológico, a leitura das lâminas foi realizada por observador às cegas e estabelecido escores de intensidade, ausente (0), leve (1), média (2), moderada (3) e intensa (4). Na análise estatística foi aplicado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância. A hipótese testada consiste na comparação entre as avaliações do animal sadio, após a indução e após a terapia celular.

Resultados

A técnica cirúrgica utilizada induziu a mudança de coloração normal do rim para vermelho escuro arroxeadado imediatamente após o clampeamento das artérias renais. Não foram identificadas alterações cardíaco-circulatórias durante o trans e pós-operatório.

As análises bioquímicas e sedimentoscopia urinária não revelaram diferenças estatísticas entre os grupos estudados ($>0,05$). Foram identificadas menores médias da relação PU/CU entre os animais do grupo G2, em comparação ao GC e G1 ao final das 24, 144 e 196 horas (Fig 1A). Diametralmente, observou-se incremento médio dos valores de GGT, ao longo de 48 horas, entre os animais dos grupos GC e G1, com posterior decréscimo após 96 horas (Fig 1B). Identificou-se proteinúria em todos os animais, a partir de uma hora transcorrida a indução do modelo de isquemia-reperfusão, com maior intensidade média da proteinúria após 24 e 196 horas pós-cirúrgico, nos grupos GC, G1, G2, respectivamente (Fig 1C).

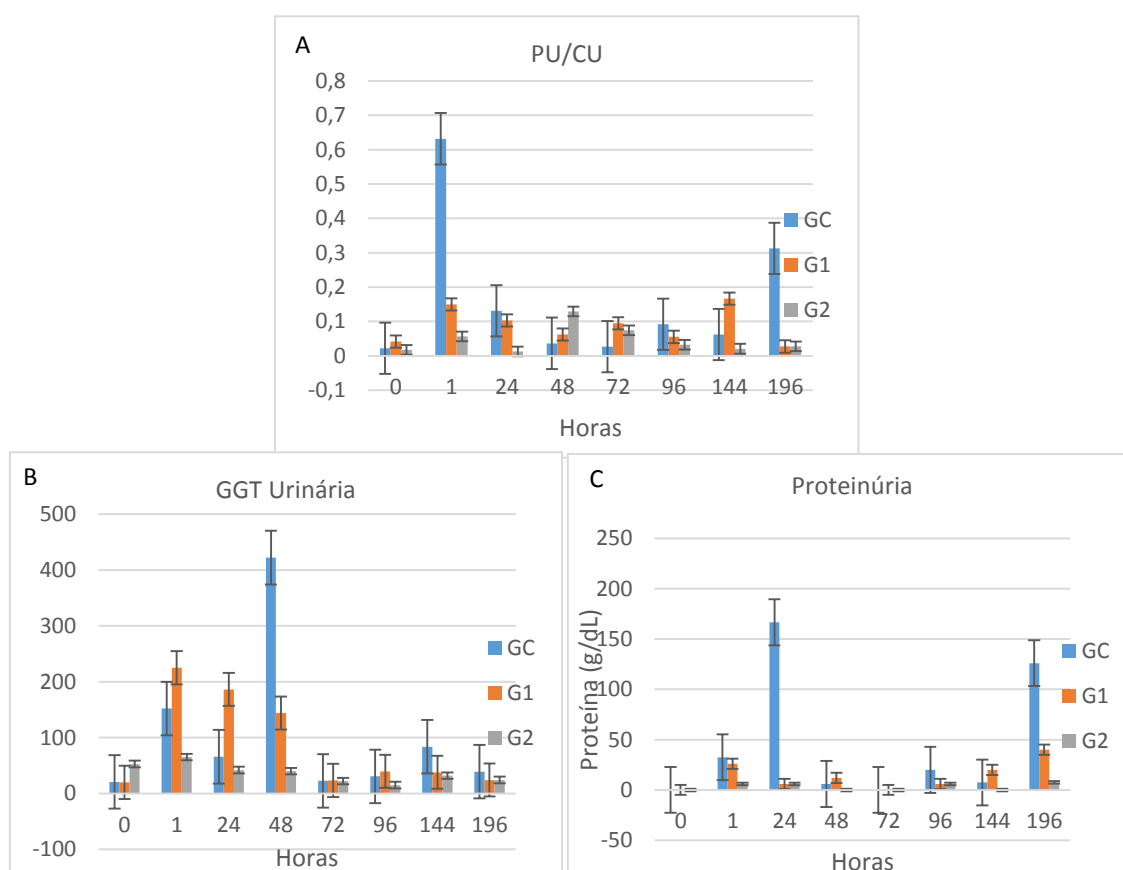


Fig 1. Valores de PU/CU (A) e GGT urinária (B). Proteinúria (C) em relação ao tempo. GC: grupo controle, G1: CTMMO-su e G2: CPHCR-su.

Os achados ultrassonográficos renais indicaram alterações morfométricas e sonográficas em todos os animais utilizados ($<0,05$). Os rins foram visualizados com morfologia ovalada, aumento do polo cranial, perda da relação córtico-medular e aumento da ecogenicidade (Fig 2A,B,C,D). Os animais do grupo GC apresentaram resultados sonográficos severamente progressivos e contínuos, ao contrário dos grupos G1 e G2, nos quais identificou-se magnificação sonográfica das lesões após 144 horas do pós operatório, com variações sutis entre os rins dos mesmos animais (Fig 2G,H).

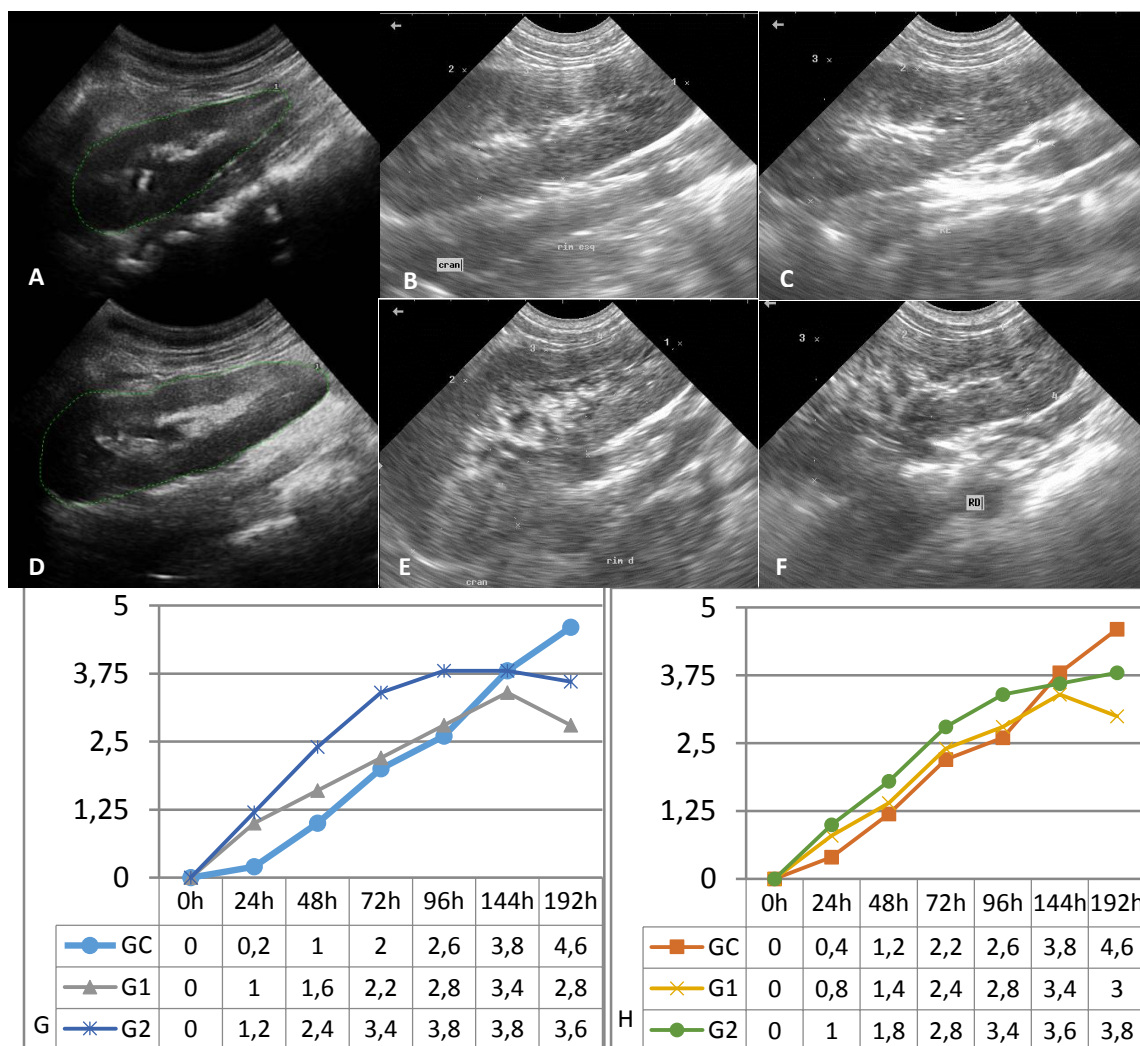


Fig 2. Ultrassonografia renal. (A) Rim esquerdo antes da indução da lesão de IRR. (B) Rim esquerdo aos 04 dias após a IRR. (C) rim esquerdo após 08 dias pós IRR. (D) Rim direito antes da lesão de IRR. (E) Rim direito aos 04 dias pós-IRR. (F) Rim direito aos 08 dias após IRR. (G e H) Alterações da morfologia renal em relação ao tempo nos grupos experimentais (G1 e G2) e controle (GC), (G) rim direito; (H) rim esquerdo.

A sorologia identificou variações da concentração das citocinas IL-4, IL-10 e TNF- α , entre os grupos e tempos analisados ($<0,05$) (Fig 3A,B,C). Ocorreram maiores variações médias com a citocina IL-4 (Fig 3A), após 144 e 192 horas, entre os grupos G2,

GC e G1; com a IL-10 (Fig 3B), após 1, 24 e 72 horas, entre os grupos G2 e GC; e com o TNF- α (Fig 3C), após 24 horas, nos grupos GC e G1, respectivamente.

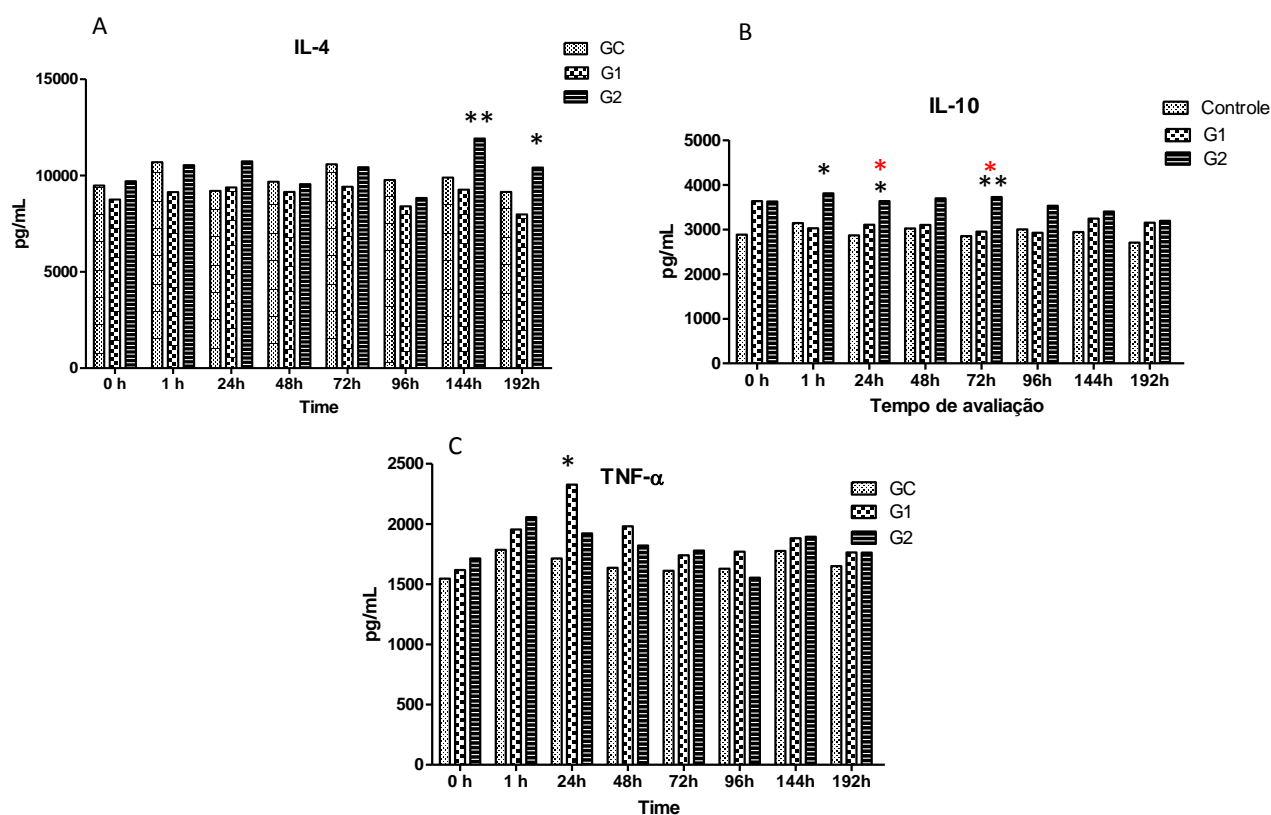


Fig 3. Perfil de citocinas TNF- α , IL-4 e IL-10, entre os grupos controle (GC), com CTMMO (G1) e CPR (G2) e entre os tempos de avaliação; (*) apresenta diferença significativa a 5%; (**) apresenta diferença significativa a 1%. (A) IL-4: apresentou valores maiores significativamente no G2 nos tempos 144h e 192h que o GC e G1. (B) IL-10: o G2 apresentou diferença estatística com o GC às 1h, 24h e 72h de avaliação (asterisco preto) e 24h e 72h com o G1 (asterisco vermelho). (C) TNF- α : G1 apresentou valores maiores estatisticamente que o GC e G2 às 24h.

A avaliação histopatológica renal identificou lesões em todos os animais, variando em tipo, intensidade e localização (<0,05). As lesões tubulares caracterizaram-se por degeneração vacuolar, necrose e ectasia (Fig 4). As menores médias de degeneração vacuolar e necrose foram observadas entre os animais do grupo G2, seguido de GC e G1, aos 4 e 8 dias. A variável ectasia apresentou comportamento similar entre os animais do grupo G2, seguido do G1, aos 4 e 8 dias. A alteração intersticial, nefrite, não diferiu entre os grupos (>0,05) (Fig 4GHI).

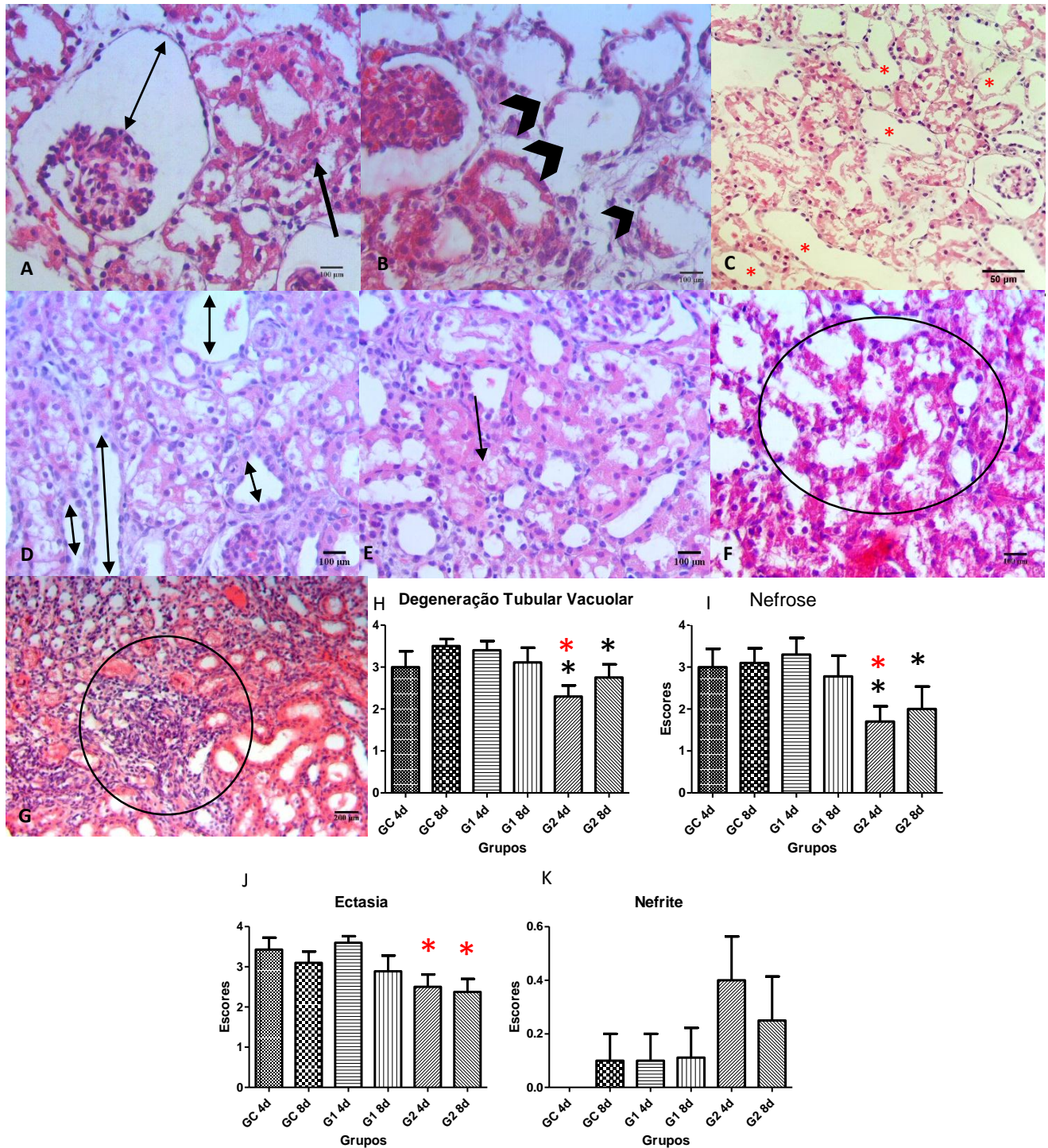


Fig 4. Fotomicrografia do córtex renal de suínos processados histologicamente e corados com Hematoxilina-eosina para análise histopatológica no GC: controle, G1: CTMMO-su e G2; CPHCR-su. (A) Aumento do espaço urinário (seta dupla), necrose/apoptose tubular (seta), 400x. (B) Necrose/apoptose tubular e tubulorrexia (cabeça de seta), 400x; (C) Ectasia tubular (asterisco vermelho), 100x. (D) túbulos com degeneração vacuolar, ectasia tubular (setas duplas), 200x. (E) degeneração tubular vacuolar (seta), 200x. (F) necrose/apoptose tubular, tubulorrexia e degeneração vacuolar (círculo), 200x. (G) nefrite intersticial (círculo), 100x. Análise estatística das lesões do parênquima renal por teste não paramétrico Kruskal-Wallis: (H) degeneração tubular vacuolar G2 diferindo significativamente do GC aos 4 e 8 dias (asterisco preto) e 4 dias do G1 (asterisco vermelho) ($p < 0,05$); (I) Necrose/apoptose tubular, G2 diferindo significativamente do GC aos 4 e 8 dias (asterisco preto) e 4 dias do G1 (asterisco vermelho) ($p < 0,05$); (J) Ectasia tubular G2 diferindo significativamente do G1 aos 4 e 8 dias (asterisco vermelho) ($p < 0,05$). (K) Nefrite intersticial sem diferença estatística entre os grupos.

O rastreamento celular permitiu a identificação de corpos celulares arredondados de CTMMO-su positivos à fluorescência no interstício renal nos animais do grupo G1. De forma similar, identificou-se marcação positiva para CPHCR-su nos túbulos, glomérulos e interstício renais nos animais do grupo G2 (Fig 5D,E,F).

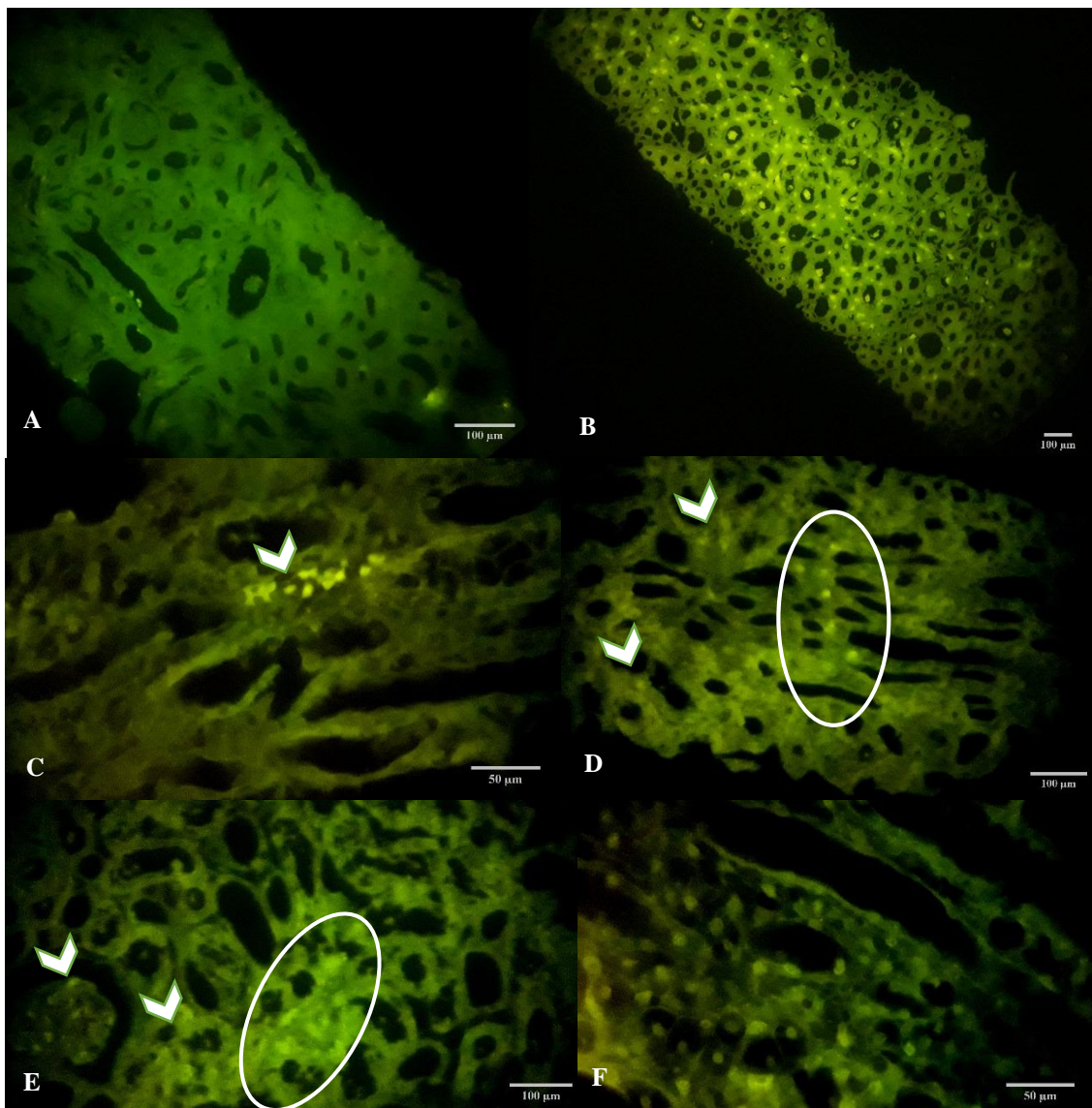


Fig 5. Rastreamento de células marcadas com nanocristais intracitoplasmáticos fluorescentes Qdots-655 no tecido renal, filtro azul. (A) Controle, 100x; (B e C) CTMMO-su no interstício renal, 50x, 400x, respectivamente; (D, E e F) CPHCR-su no interstício, túbulos e glomérulos renais, 200x, 200x e 400x, respectivamente.

Discussão

A alteração de coloração do rim após o clampeamento da artéria renal constitui-se em evidência indubitável do modelo cirúrgico adotado, visto que o rim de suínos, a semelhança de humanos e caninos, possui este único acesso vascular (17). Estudos

clássicos e contemporâneos, já descreveram a segmentação anátomo-cirúrgico renal em suídeos (18,19) e indução de isquemia por técnica cirúrgica (2,3).

A ausência de complicações no trans e pós operatório, reiteram a segurança do modelo adotado, visto que as alterações clínicas mais comuns em condições isquêmicas renais e gastrointestinais são arritmias cardíacas e hipotensão(3,20–23). Segundo estes autores a condição isquêmica induz à formação de radicais superóxidos que alteram a estabilidade elétrica dos discos intercalares miocárdicos, comprometendo a função inotrópica e cronotrópica, com reflexo negativo sobre a pressão arterial sistêmica. No presente estudo, os animais foram monitorados multiparametricamente para estas características até a completa recuperação anestésica favorecendo a segurança da análise.

Apesar da eficácia da indução por isquemia/reperfusão, as avaliações bioquímicas e sedimentoscopia urinária não identificaram alterações significativas ($>0,05$) de comprometimento glomerular e tubular. Segundo (24–28) a necrose tubular aguda é a primeira lesão grave desenvolvida em quadros de isquemia renal. A enzima gama glutamil transpeptidase é uma enzima identificada nas células epiteliais em *borda em escova* do túbulo contorcido proximal renal, sendo um biomarcador da necrose tubular precoce. Analogamente, a relação PU/CU é considerada relevante biomarcador da disfunção glomerular, a qual desenvolve-se a partir da progressão das lesões tubulares(29–31).

A especificidade dos marcadores adotados neste estudo (GGT e PU/CU) sugerem que, talvez, haja baixa sensibilidade dos mesmos em relação ao tempo de indução da lesão. Assume-se tal silogismo, dado que os modelos comumente descritos de indução de isquemia renal em suídeos, a utilizam entre 30 e 60 minutos (3,25), tal como neste trabalho. Além disso, estudos recentes (23,30)sugerem que as correlações de creatinina, em curto prazo, apresentam baixa sensibilidade para diagnóstico de lesões renais. Estes autores relatam alta variabilidade do mesmo biomarcador, no mesmo contexto clínico, em diferentes animais e sugerem que um painel de biomarcadores e múltiplas avaliações podem ser uma melhor estratégia para identificação de lesão renal aguda.

A despeito destes achados, a ultrassonografia demonstrou ser uma ferramenta de relevante sensibilidade e especificidade para lesões renais agudas, induzidas pelo modelo do presente estudo. As alterações sonográficas identificadas já haviam sido descritas por (32,33). Estes autores relataram que usualmente a pelve renal possui ecogenicidade menor que o córtex, o que favorece a precisa identificação limítrofe entre estas duas regiões. Sob

condições inflamatórias e/ou degenerativas caracterizadas por efusão difusa, há redução da ecogenicidade cortical, tornando imprecisa a identificação dos limites entre medular e córtex (33).

Como as lesões tubulares e glomerulares são as primeiras identificadas em condições agudas, admite-se que, nas condições deste estudo, a redução da ecogenicidade cortical e perda da definição córtico-medular sejam decorrentes da isquemia induzida, conforme identificado previamente por (25,34). O edema tecidual resultante provavelmente é causa das alterações na forma do órgão, identificadas pela ultrassonografia.

Entre os animais tratados, os achados ultrassonográficos sugerem maior efeito renoprotetor ($<0,05$) nos grupos G1 e G2, submetidos à terapia com CTMMO-su e CPHCR-su (Fig 2). Nestes grupos, houve menor evidência ultrassonográfica de hipoecogenicidade, perda dos limites córtico-medulares e deformação do polo renal, quando comparados ao grupo GC. Não foram encontrados na literatura médica especializada, evidências sonográficas renais de pacientes tratados com CTMMO-su e CPHCR-su. Contudo, há extensa documentação científica demonstrando reparação do tecido renal tratado com CPR-su (6,11–14). Como as CTMMO-su e CPHCR-su são grupos celulares multipotentes (35–38), acredita-se que o mesmo ocorra neste estudo e reflita-se nos achados sonográficos.

O comportamento multipotente e imunomodulador das CTMMO-su e CPHCR-su tem sido amplamente investigado (39–42). No presente estudo, a avaliação do perfil de citocinas IL-4, IL-10 e TNF- α , entre os animais tratados, sugere que as CTMMO-su exerceram efeito imunoestimulador pela indução da expressão de TNF- α em detrimento ao estímulo da expressão de IL-4 e IL-10 ($<0,05$). O papel estimulador das CTM é controverso e os mecanismos possivelmente envolvidos permanecem obscuros (39,42,43).

Um estudo contemporâneo (42) utilizou CTMMO-su de crista ilíaca, tal qual o estudo ora apresentado, e referiu limitada imunomodulação supressiva destas células em lesão renal aguda. Os referidos autores descreveram que as CTMMO-su não inibiram reação mista de linfócitos e estimularam a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α .

Fosfolipídeos de membrana celular, como a *esfingosina 1 fosfatase*, e lipopolissacarídeos circulantes tem sido sugeridos como possíveis agonistas que

contribuiriam ao perfil imunestimulador das CTM (44–47). Contudo, tal hipótese ainda carece de confirmação.

Não obstante, a restrita administração de antiinflamatório não esteroidal não comprometeu os resultados obtidos, haja visto que todos os animais, independente do tratamento, expressaram TNF- α ($<0,05$).

Diferentemente, o tratamento com CPHCR-su com modulação negativa para TNF- α sugere menor reação inflamatória. Este fato deve-se a característica heterogênea da CPHCR-su, que, provavelmente, não são uma linhagem específica de células multipotentes. Mas um conjunto de células progenitoras, dentre as quais, progenitoras renais CD133⁺, CTM renais e/ou pericitos CD140b⁺/CD90⁺. Corroborar a esta hipótese a identificação deste perfil imunofenotípico nas CPHCR-su deste estudo.

Desta forma, o aumento de IL-10 e IL-4 no grupo tratado com CPHCR-su, sugere provável manutenção de resposta Th2 antiinflamatória, inibindo diretamente a expressão de TNF- α e estimulando citocinas Th2 (48). Semelhante comportamento foi identificado em estudos utilizando progenitoras renais CD133⁺ na LRA induzida (11,12,14).

O perfil das citocinas deste estudo é corroborado pela análise histopatológica, pois houve marcante redução ($<0,05$) das lesões de degeneração vacuolar, necrose e ectasia entre os grupos tratados (Fig 4).

As amostras renais dos animais dos grupos GC e G1 exibiram presença de degeneração vacuolar, necrose e ectasia tubular, sem distinção de intensidade entre ambos ($>0,05$). Provavelmente a persistência da resposta inflamatória, conforme demonstrado no aumento da expressão de TNF- α , intensificou a resposta retículo endotelial e favoreceu a persistência das lesões identificadas.

De forma oposta, as amostras renais dos animais dos grupos G2 exibiram atenuação das lesões de degeneração vacuolar, necrose e ectasia, comuns da LRA em suínos (28,26).

Por meio do rastreamento celular, foi possível observar que as CTMMO-su e CPHCR-su migraram para áreas lesionadas, com predominância das primeiras no interstício e as segundas, nos túbulos, glomérulos e interstício.

Estes dados sugerem maior capacidade migratória das CPHCR-su em relação as CTMMO-su, o que poderá ter contribuído à menor intensidade de lesões histopatológicas identificadas no grupo G2. Tal fato pode ser intensificado pela provável presença de progenitoras renais CD133⁺, CTM renais e/ou pericitos CD140b⁺/CD90⁺ entre as

CPHCR-su, conforme proposto por (12,15,38,49–51). Autores sugerem que a existência de uma “*memória molecular*” poderia favorecer a reparação do tecido de mesma origem da célula progenitora utilizada (13). Desta forma, as progenitoras renais, em teoria, estariam mais comprometidas no desenvolvimento do tecido renal, que progenitoras da medula óssea, por exemplo (13,40,52).

Também foi sugerido por estudos recentes que os progenitores renais apresentam maior ação antioxidante, maior resistência a morte e maior potencial proliferativo que outras células renais (14,15). Tais características podem contribuir para a redução da severidade das LRA, quando comparado às CTMMO-su.

Conclusão

A terapia com células progenitoras heterogêneas do córtex renal de suínos possibilitou maior efeito renoprotetor com marcante redução das lesões, referentes à degeneração vacuolar, necrose e ectasia tubular na lesão de isquemia/reperfusão renal, comparada ao tratamento com as células tronco mesenquimais da medula óssea de suínos. Ademais, quanto ao efeito imunomodulador, as células progenitoras heterogêneas do córtex renal de suínos estimularam *in vivo* uma ação parácrina mais desejável ao efeito de renoproteção em relação as células tronco mesenquimais.

Referências

1. Jang HR, Park JH, Kwon GY, Lee JE, Huh W, Jin HJ, et al. Effect of preemptive treatment with human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on the development of renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2014;307(10):F1149-61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25143451>
2. Bezerra D de O, Feitosa MLT, Almeida HM de, Costa FAL, Braga JFV, Souza F de AL, et al. Collared Pecary (tayassu tajacu) as a new model of renal ischemic injury induced by clamping the renal artery. *Acta Cir Bras* [Internet]. 2014;29(9):560–72. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502014000900560&lng=en&tlng=en
3. Hauet T, Giraud S, Favreau F, Chatauret N, Thuillier R, Maiga S. Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: The preclinical model. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011.
4. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol* [Internet]. 2006;141(2):312–22. Available from: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.106.077073>
5. Williams TM, Wise AF, Layton DS, Ricardo SD. Phenotype and influx kinetics of leukocytes and inflammatory cytokine production in kidney ischemia/reperfusion injury. *Nephrology* [Internet]. 2018;23(1):75–85. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/nep.12941>
6. Dekel B, Shezen E, Even-Tov-Friedman S, Katchman H, Margalit R, Nagler A, et al. Transplantation of Human Hematopoietic Stem Cells into Ischemic and Growing Kidneys Suggests a Role in Vasculogenesis but Not Tubulogenesis. *Stem Cells* [Internet]. 2006;24(5):1185–93. Available from:

- <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2005-0265>
7. Collino F, Pomatto M, Bruno S, Lindoso RS, Tapparo M, Sicheng W, et al. Exosome and Microvesicle-Enriched Fractions Isolated from Mesenchymal Stem Cells by Gradient Separation Showed Different Molecular Signatures and Functions on Renal Tubular Epithelial Cells. *Stem Cell Rev Reports. Stem Cell Reviews and Reports*; 2017;13(2):226–43.
 8. Lin KC, Yip HK, Shao PL, Wu SC, Chen KH, Chen YT, et al. Combination of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes for protecting kidney from acute ischemia-reperfusion injury. *Int J Cardiol [Internet]. Elsevier B.V.*; 2016;216:173–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.04.061>
 9. Patel J, Pancholi N, Gudehithlu KP, Sethupathi P, Hart PD, Dunea G, et al. Stem cells from foreign body granulation tissue accelerate recovery from acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant [Internet]*. 2012;27(5):1780–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22036939>
 10. Tögel F, Hu Z, Weiss K. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Ren Physiol [Internet]*. 2005;289:31–42. Available from: <http://ajprenal.physiology.org/content/289/1/F31.short>
 11. Angelotti ML, Ronconi E, Ballerini L, Peired A, Mazzinghi B, Sagrinati C, et al. Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. *Stem Cells*. 2012;30(8):1714–25.
 12. Aggarwal S, Grange C, Iampietro C, Camussi G, Bussolati B. Human CD133 + Renal Progenitor Cells Induce Erythropoietin Production and Limit Fibrosis after Acute Tubular Injury. *Sci Rep [Internet]. Nature Publishing Group*; 2016;6(November):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep37270>
 13. Ranghino A, Bruno S, Bussolati B, Moggio A, Dimuccio V, Tapparo M, et al. The effects of glomerular and tubular renal progenitors and derived extracellular vesicles on recovery from acute kidney injury. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2017;8(1):1–15.
 14. Grange C, Moggio A, Tapparo M, Porta S, Camussi G, Bussolati B. Protective effect and localization by optical imaging of human renal CD133+ progenitor cells in an acute kidney injury model. *Physiol Rep [Internet]*. 2014;2(5):e12009. Available from: <http://physreports.physiology.org/content/2/5/e12009.abstract>
 15. Yamaleyeva LM, Guimaraes-Souza NK, Krane LS, Agcaoili S, Gyabaah K, Atala A, et al. Cell therapy with human renal cell cultures containing erythropoietin-positive cells improves chronic kidney injury. *Stem Cells Transl Med [Internet]*. 2012;1(5):373–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197816> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3659702>
 16. Costa CRM, Feitosa MLT, Bezerra DO, Carvalho YKP, Olivindo RFG, Fernando PB, et al. Labeling of adipose-derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent signal for ex vivo cell tracking. *Vitr Cell Dev Biol - Anim. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*; 2017;53(4):363–70.
 17. Reolon J, Gomes JO, Motter SA. Caracterização Vascular Dos Setores E Segmentos. 2010;93–7.
 18. Carvalho MAM, Machado GV, Augusto A, Machado N, Vale EF. Segmentação anatomo-cirúrgica arterial do rim de javali (*Sus scrofa*) adulto. 2006;19(4):85–90.
 19. Romagnolli P. Segmentos arteriais dos rins de queixadas (*Tayassu pecari* Link , 1795) Arterial segments of kidneys in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari* Link , 1795). 2003;40:205–12.
 20. Dessen M. ARTIGO DE REVISÃO 12 Abordagem da insuficiência renal aguda. XIV.
 21. Benoit SW, Devarajan P. Acute kidney injury: emerging pharmacotherapies in current clinical trials. *Pediatr Nephrol. Pediatric Nephrology*; 2017;1–9.
 22. Schwartz LM. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and

- ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *AJP Hear Circ Physiol* [Internet]. 2005;290(3):H1011–8. Available from: <http://ajpheart.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpheart.00864.2005>
23. Peres LAB, Cunha Júnior AD da, Schäfer AJ, Silva AL da, Gaspar AD, Scarpari DF, et al. Biomarkers of acute kidney injury. *J Bras Nefrol* [Internet]. 2013;35(3):229–36. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0101-2800.20130036>
 24. Costa JA da, Neto MM, Neto O. Insuficiência renal aguda na terapia intensiva. *Med Ribeirão Preto*. 1998;31:532–51.
 25. de Castro e Silva Jr. O, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Dal Sasso K. Basics aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. *Acta Cir Bras* [Internet]. 2002;17(Suplement 3):96–100. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502002000900020&script=sci_arttext
 26. Zuk A, Bonventre J V. Acute Kidney Injury. *Annu Rev Med* [Internet]. 2016;67(1):293–307. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-050214-013407>
 27. Yoshida M, Honma S. Regeneration of Injured Renal Tubules. *J Pharmacol Sci* [Internet]. 2014;124(2):117–22. Available from: <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/jphs/13R12CP?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>
 28. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Ren Inj Prev* [Internet]. 2015;4(2):20–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26060833%5Chttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4459724>
 29. Gama-glutamil ACFZ. Gama-Glutamil Transpeptidase Urinária Como Indicador De Insuficiência Renal Aguda Induzida Por Gentamicina Em Cães. 2007;111–6.
 30. Magro MCS, Vattimo MFF. Avaliação da Função Renal: Creatinina e outros Biomarcadores. *Rev Bras Ter Intensiva* [Internet]. 2007;19(2):182–5. Available from: <papers3://publication/uuid/AD90256C-977E-4C0C-B7BA-C89342080F20>
 31. Sodré FL, Costa JCB, Lima JCC. Evaluation of renal function and damage: a laboratorial challenge. *J Bras Patol e Med Lab* [Internet]. 2007;43(5):329–37. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442007000500005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 32. Silva VC da, Mamprim MJ, Vulcano LC. Ultra-Sonografia No Diagnóstico Das Doenças Renais Em Pequenos Animais. *Veterinária e Zootec*. 2008;15(3):435–44.
 33. Araújo NC, Rioja L da S, Rebelo MAP. Doença parenquimatosa renal: correlação histológico-sonográfica. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2008;54(1):48–54. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302008000100020&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 34. Requião-Moura LR, Durão Junior M de S, Matos ACC de, Pacheco-Silva A. Ischemia and reperfusion injury in renal transplantation: hemodynamic and immunological paradigms. *Einstein (São Paulo)* [Internet]. 2015;13(1):129–35. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082015000100023&lng=en&tlng=en
 35. Schwartz RE, Hu W, Catherine M, Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells Find the latest version : Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. 2002;
 36. Raedt R, Pinxteren J, Dycke A Van, Waeytens A, Craeye D. Differentiation assays of bone marrow-derived Multipotent Adult Progenitor Cell (MAPC) -like cells towards neural cells cannot depend on morphology and a limited set of neural markers. 2007;203:542–54.
 37. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kren S, Eidman K, Connaire J, et al. Isolation and Characterization of Kidney-Derived Stem Cells. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2006;17(11):3028–40. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2006030275>

38. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2005;166(2):545–55. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62276-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62276-6)
39. Zhang R, Liu Y, Yan K, Chen L, Chen XR, Li P, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2013;10:106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23971414>
40. Pelekanos RA, Li J, Gongora M, Chandrakanthan V, Scown J, Suhaimi N, et al. Comprehensive transcriptome and immunophenotype analysis of renal and cardiac MSC-like populations supports strong congruence with bone marrow MSC despite maintenance of distinct identities. *Stem Cell Res* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;8(1):58–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2011.08.003>
41. Semedo P, Correa-Costa M, Cenedeze MA, Malheiros DMAC, Dos Reis MA, Shimizu MH, et al. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells*. 2009;27(12):3063–73.
42. Brunswig-spickenheier B, Boche J, Westenfelder C, Peimann F, Gruber AD, Jaquet K, et al. Limited Immune-Modulating Activity of Porcine Mesenchymal Stromal Cells Abolishes Their Protective Efficacy in Acute Kidney Injury. 2010;19(5).
43. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Transplantation* [Internet]. 2009;105(4):1815–22. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/105/4/1815.abstract>
44. Zhou L, Song Q, Shen J, Xu L, Xu Z, Wu R, et al. Comparison of human adipose stromal vascular fraction and adipose-derived mesenchymal stem cells for the attenuation of acute renal ischemia/reperfusion injury. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017;7(68):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep44058>
45. Kunkel GT, MacEyka M, Milstien S, Spiegel S. Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;12(9):688–702. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4099>
46. Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Murakami T, et al. Essential Roles of Sphingosine 1-Phosphate/S1P₁ Receptor Axis in the Migration of Neural Stem Cells Toward a Site of Spinal Cord Injury. *Stem Cells* [Internet]. 2007;25(1):115–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2006-0223>
47. Li C, Kong Y, Wang H, Wang S, Yu H, Liu X, et al. Homing of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by sphingosine 1-phosphate contributes to liver fibrosis. *J Hepatol* [Internet]. European Association for the Study of the Liver; 2009;50(6):1174–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.028>
48. Romagnani S. The Th1 / Th2 paradigm. 1997;
49. Qi W, Johnson DW, Vesey DA, Pollock CA, Chen X. Isolation, propagation and characterization of primary tubule cell culture from human kidney (Methods in Renal Research). *Nephrology*. 2007;12(2):155–9.
50. da Silva Meirelles L, Malta TM, de Deus Wagatsuma VM, Palma PVB, Araújo AG, Ribeiro Malmegrim KC, et al. Cultured Human Adipose Tissue Pericytes and Mesenchymal Stromal Cells Display a Very Similar Gene Expression Profile. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2015;24(23):2822–40. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2015.0153>
51. da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* [Internet]. 2006;119(11):2204–13. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.02932>
52. Park H, Yasuda K, Kuo M, Ni J, Ratliff B, Chander P, et al. Renal capsule as a stem cell niche Renal capsule as a stem cell niche. 2011;(March 2010):1254–63.

CONCLUSÕES GERAIS

Esta pesquisa traz informações altamente relevantes sobre as células progenitoras heterogêneas do córtex renal e técnicas de isolamento e cultivo que permitiram identificar semelhanças entre as CPHCR-su e CTMMO-su, como pluripotência e expressão positiva para CD140b e CD90. Possivelmente, este fato se deve ao *pool* celular conter, além de CPR, células como CTM e/ou pericitos. Desta forma, o protocolo de isolamento utilizado não seleciona apenas células progenitoras renais e se faz necessário, estudos mais direcionados à senescência e cariotipagem para completa caracterização destas células em cultivo.

Com base nos achados teciduais e laboratoriais, podemos concluir que os animais tratados com células progenitoras heterogêneas do córtex renal apresentaram melhores resultados quando comparados ao grupo controle e grupo tratamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. Contudo, faz-se necessário estudos mais detalhados sobre o comparativo com células-tronco mesenquimais de outros sítios de coleta, com a potencialização da ação parácrina por reprogramação celular ou até mesmo a combinação dos dois tipos celulares. Além de pesquisas com outros tipos de modelos pré-clínicos como lesões renais crônicas, e para avaliação do efeito imunomodulador isolado destas células para conservação de órgãos em transplantes renais e pós-transplante.