

ELÍS ROSÉLIA DUTRA DE FREITAS SIQUEIRA SILVA

**ESTRESSE OXIDATIVO E INTEGRIDADE GENÔMICA *IN SITU* E *IN VITRO*  
DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PROGENITORAS RENAIIS NA  
REGENERAÇÃO DA ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM RIM SUÍNO**

TERESINA-PI  
2019

ELÍS ROSÉLIA DUTRA DE FREITAS SIQUEIRA SILVA

**ESTRESSE OXIDATIVO E INTEGRIDADE GENÔMICA *IN SITU* E *IN VITRO*  
DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PROGENITORAS RENAI NA  
REGENERAÇÃO DA ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM RIM SUÍNO**

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.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho

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

**S586e** Silva, Elís Rosélia Dutra de Freitas Siqueira

Estresse oxidativo e integridade genômica *in situ e in vitro* de células - tronco mesenquimais e progenitoras renais na regeneração da isquemia / reperusão em rim suíno. / Elís Rosélia Dutra de Freitas Siqueira Silva 2019.

73 f. : il.

Tese ( Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Teresina, 2019.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Acelina Martins de Carvalho

1.Células- tronco 2.Danos ao DNA 3. Estresse oxidativo 4.Nefropatia  
5.Regeneração I.Título

**CDD 575.1**

**ESTRESSE OXIDATIVO E INTEGRIDADE GENÔMICA *IN SITU* E *IN VITRO*  
DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PROGENITORAS RENAIIS NA  
REGENERAÇÃO DA ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM RIM SUÍNO**

**ELIS ROSELIA DUTRA FREITAS SIQUEIRA SILVA**

Tese aprovada em: 10/06/2019

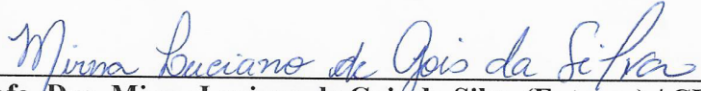
Banca Examinadora:

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

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

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo (Interno) / DBF/CCS/UFPI

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Dayseanny de Oliveira Bezerra (Externa) / IFPI

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Mirna Luciano de Gois da Silva (Externa) / CEAD

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”*

Louis Pasteur

*Dedico,*

*A Deus pelo amor, misericórdia e bondade que me capacita e fortalece na busca dos meus sonhos.*

*A minha mãe Mirtes Amélia por me amar incondicionalmente e ser meu exemplo de fé, força e perseverança nas provações da vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e seu amor misericordioso. Por sempre me conceder bênçãos e fortalecer minha fé estando ao meu lado durante os obstáculos e provações.

À Universidade Federal do Piauí pelas oportunidades durante a vida acadêmica no curso de medicina veterinária e na pós-graduação durante o mestrado e doutorado realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) pela colaboração financeira para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Prof. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho pelo acolhimento na minha admissão no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt), bem como os aprendizados, incentivo e oportunidades que contribuíram para minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto pelos valiosos ensinamentos e paciência no cultivo de célula-tronco e na produção científica.

À Prof. Dra. Dayseanny de Oliveira Bezerra pela parceria na realização do experimento e a amizade com amparo e conselhos valorosos.

Ao Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo e à Prof. Dra. Mirna Luciano de Gois da Silva pela disponibilidade na participação como membros da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Antônio Luiz Gomes Júnior por toda ajuda, disponibilidade, solidariedade e atenção em cada técnica e ensinamento que tornou essa pesquisa possível.

Aos amigos de pesquisa do NUPCelt: Lucilene, Marina, Renata, Yulla, Clautina, Lorena, Charlys, Gustavo, Huanna, Iago, Ronielle, Thais e Larisy por contribuírem nas pesquisas e proporcionar momentos de descontração. Em especial, ao Wanderson Gabriel pela amizade e motivação diante as dificuldades na execução da pesquisa.

Aos Funcionários do NUPCelt: Fabiana, Leiliane, Janete, Hermínio, Cleiton, Flávia e Luciana por colaborar diariamente com assistência e empatia no ambiente de trabalho.

Aos Professores e Alunos da Universidade Estadual do Piauí (UESPI) pela compreensão, apoio e incentivo durante o desenvolvimento do curso.

Aos amigos Leopoldo, Camila, Juliana e Julliet que me acompanham na vida acadêmica do curso de medicina veterinária com uma convivência divertida e acolhedora, em especial a Emanuela Ribeiro Moura que desde a escola compartilhava os momentos de aprendizado e superação.

À minha família que compartilha comigo a alegria de cada conquista, em especial minha mãe Mirtes Amélia pelo amor imensurável, meu pai Robson Ferreira pelo carinho e atenção e meu irmão Romerson Luiz pelo incentivo que me torna a cada dia uma pessoa melhor. Ao meu namorado, José Ricardo pelo companheirismo e motivação na realização dessa conquista.

E a todos que contribuíram de alguma forma com a realização desse sonho.



**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b>	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xiii
<b>RESUMO</b>	xiv
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b>	16
<b>CAPÍTULO I: ANÁLISE DA VIABILIDADE, INSTABILIDADE GENÔMICA E ESTRESSE OXIDATIVO IN VITRO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E PROGENITORAS RENAI SUÍNAS EM DIFERENTES PASSAGENS</b>	23
<b>RESUMO</b>	24
<b>INTRODUÇÃO</b>	25
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	26
<b>RESULTADOS</b>	30
<b>DISCUSSÃO</b>	36
<b>CONCLUSÃO</b>	39
<b>REFERÊNCIAS</b>	40
<b>CAPÍTULO II: POTENCIAL REGENERATIVO, ANTIOXIDANTE E GENOPROTETOR DE CÉLULAS PROGENITORAS RENAI E DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM LESÃO DO RIM DE SUÍNOS</b>	43
<b>RESUMO</b>	44
<b>INTRODUÇÃO</b>	45
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	46
<b>RESULTADOS</b>	51
<b>DISCUSSÃO</b>	59
<b>CONCLUSÃO</b>	61
<b>REFERÊNCIAS</b>	62
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	66
<b>REFERÊNCIAS</b>	67

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I: ANÁLISE DA VIABILIDADE, INSTABILIDADE GENÔMICA E ESTRESSE OXIDATIVO IN VITRO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E PROGENITORAS RENAI SUÍNAS EM DIFERENTES PASSAGENS.

- Figura 1. Expressão de marcadores para célula-tronco mesenquimal suínas por citometria de fluxo. Branco de FITC e APC (**A**) para CD14- (**B**) e CD105+ (rosa) (**C**); Branco de APC (**D**) para CD133- (**E**) e CD140b+ (verde) (**F**); Branco (**G**) de FITC para CD24- (**H**) e CD106+ (vermelho) (**I**); Branco de APC (**J**) para CD90+ (roxo) (**K**). 33
- Figura 2. Expressão de marcadores para célula progenitora renal suína por citometria de fluxo. Branco de FITC e APC (**A**) para CD133+ (amarelo) e CD24- (**B**), CD106+ (vermelho) e CD133+/CD106+ (amarelo) (**C**); Branco de FITC (**D**) e de APC e PE (**E**) para CD106+ /CD140b+ (vermelho) e CD140b+ (verde) (**F**) e para CD14-, CD90+ (roxo), CD105+(rosa) e CD90+/CD105+(amarelo) (**G**). 37
- Figura 3. Análise da expressão de anexina-V(PE)/7-AAD por citometria de fluxo para marcação de apoptose/necrose em diferentes passagens de células progenitoras renais (**A**. precoce; **C**. terapêutica; **E**. tardia) e células tronco mesenquimais (**B**. precoce; **D**. terapêutica; **F**. tardia) suínas com representação gráfica da porcentagem de células em apoptose (**G**) e em necrose (**H**). 38
- Figura 4. Classificação de danos ao DNA (seta 2, 3 e 4) de células-tronco mesenquimais (**A**) e células-progenitoras renais (**B**) suínas. 38

### CAPÍTULO II: POTENCIAL REGENERATIVO, ANTIOXIDANTE E GENOPROTETOR DE CÉLULAS PROGENITORAS RENAI E DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM LESÃO DO RIM DE SUÍNOS

- Figura 1. Marcação por imunistoquímica de Ki67 (marcador nuclear de proliferação celular) em rim suíno. **A**. Grupo Controle no dia 4; **B**. Grupo Controle no dia 8; **C**. Grupo Experimental tratado com CTM no dia 4; **D**. Grupo Experimental tratado com CTM no dia 8; **E**. Grupo Experimental tratado com CPR no dia 4; **F**. Grupo Experimental tratado com CPR no dia 8. 54
- Figura 2. Marcação por imunistoquímica de caspase-3-clivada (marcador nuclear de apoptose) em rim suíno. **A**. Grupo Controle no dia 4; **B**. Grupo Controle no dia 8; **C**. Grupo Experimental tratado com CTM no dia 4; **D**. Grupo Experimental tratado com CTM no dia 8; **E**. Grupo Experimental tratado com CPR no dia 4; **F**. Grupo Experimental tratado com CPR no dia 8. 54
- Figura 3. Marcação por imunistoquímica de VEGF (marcador intracitoplasmático de angiogênese) em rim suíno. **A**. Grupo Controle no dia 4; **B**. Grupo Controle no dia 8; **C**. Grupo Experimental tratado com CTM no dia 4; **D**. Grupo Experimental tratado com CTM no dia 8; **E**. Grupo Experimental tratado com CPR dia 4; **F**. Grupo Experimental tratado com CPR no dia 8. 54

Figura 4. Classificação de danos ao DNA (seta 0, 1, 2, 3 e 4) em tecido renal de suínos 54 analisados pelo Ensaio Cometa. **A.** Grupo com tratamento CTM; **B.** Grupo com tratamento CPR.

## LISTA DE GRÁFICOS

### CAPÍTULO I: ANÁLISE DA VIABILIDADE, INSTABILIDADE GENÔMICA E ESTRESSE OXIDATIVO IN VITRO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E PROGENITORAS RENAI SUÍNAS EM DIFERENTES PASSAGENS

- Gráfico 1. Ensaio calorimétrico de MTT sobre as viabilidades de células-tronco 38  
mesenquimais (**A**) e células progenitoras renais (**B**) suínas.
- Gráfico 2 Avaliação da frequência (**A**) e índice (**B**) dos danos ao DNA em células 34  
progenitoras renais e células-tronco mesenquimais suínas nas diferentes  
passagens de cultivo. \*diferença significativa quando comparado passagem  
precoce da respectiva linhagem; # diferença significativa quando  
comparado ao grupo célula-tronco mesenquimal na mesma passagem.  
ANOVA - *Neuman-Keuls*.  $p < 0,05$ .
- Gráfico 3. Mensuração do teor de nitrito (**A**) e níveis de peroxidação lipídica (**B**) em 35  
células progenitoras renais e células-tronco mesenquimais suínas nas  
diferentes passagens de cultivo. \* diferença significativa quando comparado  
passagem precoce da respectiva linhagem; # diferença significativa quando  
comparado ao grupo célula-tronco mesenquimal na mesma passagem.  
ANOVA - *Neuman-Keuls*.  $p < 0,05$ .
- Gráfico 4. Atividade de enzimas antioxidantes (**A**. Glutationa reduzida – GSH; **B**. 35  
Catalase) em células progenitoras renais e células tronco mesenquimais  
suínas nas diferentes passagens de cultivo. \*diferença significativa quando  
comparado passagem precoce da respectiva linhagem. ANOVA -  
*Neuman-Keuls*.  $p < 0,05$ .

### CAPÍTULO II: POTENCIAL REGENERATIVO, ANTIOXIDANTE E GENOPROTETOR DE CÉLULAS PROGENITORAS RENAI E DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM LESÃO DO RIM DE SUÍNOS

- Gráfico 1. Análise quantitativa da proliferação celular (ki-67: marcador nuclear) em 53  
rim de suínos por grupos de tratamento (GC: controle, GE1: CTM e GE2:  
CPR) após 4 e 8 dias da indução da lesão de isquemia-reperfusão. **A**.  
Marcação total de células; **B**. Marcação de células tubulares; **C**. Marcação  
de células intersticiais; **D**. Marcação de células glomerulares. \* diferença  
significativa entre GE1 com GC e GE2 no mesmo dia de tratamento; #  
diferença significativa do GC e GE2 do dia 4 com GE1 do dia 8. ANOVA  
*two way-Tukey*.  $p < 0,05$
- Gráfico 2 Análise quantitativa da apoptose celular (Caspase-3-clivada: : marcador 56  
nuclear) em rim de suínos por grupos de tratamento (GC: controle, GE1:  
CTM e GE2; CPR) após 4 e 8 dias da indução da lesão de isquemia-  
reperfusão. **A**. Marcação total de células; **B**. Marcação de células tubulares;  
**C**. Marcação de células intersticiais # diferença significativa entre GE1 e  
GE2 do dia 4 com o GC do dia 8. ANOVA *two way-Tukey*.  $p < 0,05$ .

- Gráfico 3 Análise por escore da angiogênese (VEGF: marcador de 56 intracitoplasmático) em rim de suínos por grupos de tratamento (GC: controle, GE1: CTM e GE2: CPR) após 4 e 8 dias da indução da lesão de isquemia-reperfusão. **A.** Marcação total de células; **B.** Marcação de células tubulares; **C.** Marcação de células intersticiais; **D.** Marcação de células glomerulares; **E.** Marcação de vasos peritubulares. \* diferença significativa entre o GE1 e GE2 com o GC no mesmo dia de tratamento; #diferença significativa do GE2 do dia 8 com GC do dia 4; ## diferença significativa entre GE1 e GE2 do dia 8 com GC do dia 4. ANOVA *two way* - *Tukey*.  $p < 0,05$ .
- Gráfico 4 Mensurações dos níveis de peroxidação lipídica e teor de nitrito no 56 tratamento com CTM (GE1) e CPR (GE2) em rim de suínos submetidos a lesão de isquemia-reperfusão. **A.** Nitrito. **B.** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). \*diferença significativa quando comparado ao grupo controle (GC). ANOVA - *Neuman-Keuls*.  $p < 0,05$ .
- Gráfico 5 Atividade de enzimas antioxidantes no tratamento com CTM (GE1) e CPR 56 (GE2) em rim de suínos submetidos a lesão de isquemia-reperfusão. **A.** Glutathiona reduzida (GSH). **B.** Catalase. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). \* diferença significativa quando comparado ao grupo controle (GC). ANOVA - *Neuman-Keuls*.  $p < 0,05$ .
- Gráfico 6 Avaliação seriada da genotoxicidade do tratamento com CTM (GE1) e CPR 56 (GE2) em rim de suínos submetidos a lesão de isquemia-reperfusão. **A.** Frequência de danos; **B.** Índice de danos. \* diferença significativa quando comparado ao grupo controle negativo (CN) do respectivo grupo; # diferença significativa quando comparado ao grupo tratado com GE1 no mesmo dia do tratamento. ANOVA - *Neuman-Keuls*.  $p < 0,05$ .

**LISTA DE TABELAS****CAPÍTULO I: ANÁLISE DA VIABILIDADE, INSTABILIDADE GENÔMICA E ESTRESSE OXIDATIVO IN VITRO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E PROGENITORAS RENAI SUÍNAS EM DIFERENTES PASSAGENS**

Tabela 1. Relação de anticorpos monoclonais conjugados utilizados para 57  
caracterização imunofenotípica de CPR e CTM suínas por citometria de  
fluxo.

## RESUMO

A terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) e células progenitoras renais (CPR) tem demonstrado interesse crescente devido a sua possível capacidade regenerativa e imunossupressora em diversas nefropatias, incluindo na lesão de isquemia-reperfusão renal (IRR). Contudo, para a aplicação clínica dessas células deve haver uma extensa segurança com estudos direcionados a manutenção das condições de cultivo durante sua expansão e com observância em ensaios clínicos experimentais. O objetivo deste estudo foi avaliar o estresse oxidativo e os danos ao DNA das células-tronco mesenquimais e progenitoras renais *in vitro* e *in situ*, com análise da proliferação, apoptose e angiogênese em suínos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão renal. Foram utilizadas CTM da medula óssea e CPR do córtex renal de suínos utilizando passagens precoce, terapêutica e tardia para análise do cultivo durante a expansão. Para avaliação *in situ*, 15 suínos foram submetidos à IRR por indução cirúrgica e receberam a terapia celular, nos quais foram divididos em três grupos: Controle (GC), tratamento com CTM (GE1) e com CPR (GE2). Foram coletados fragmentos de tecido renal mediante biópsias seriadas, dia 4 e 8, para análise da proliferação celular, apoptose e a angiogênese por imunistoquímica, avaliação do dano ao DNA pelo ensaio de cometa, e o estresse oxidativo pela mensuração dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS), nitrito e atividade dos sistemas antioxidantes (glutathiona reduzida-GSH e catalase). A estatística dos dados obtidos foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de *Tuckey* e *Neuman-Keuls*. Na caracterização imunofenotípica de CTM observou-se marcação CD14-, CD24-, CD133-, CD105+, CD90+, CD106+ e CD140b+ e para CPR obteve-se marcação CD14-, CD24-, CD133+, CD105+, CD90+, CD106+ e CD140b+. A curva de viabilidade celular se estendeu até o dia 15 para CPR e dia 21 para CTM. As duas linhagens apresentaram a passagem inicial com alto nível de apoptose e baixo de necrose, com inversão na passagem terapêutica, e altos níveis na tardia. A passagem precoce de CTM e CPR indicou menor índice de danos do que a fase terapêutica e tardia. As passagens de CPR expressaram baixos níveis de peroxidação lipídica e nitrito quando comparada a CTM, e atividade de enzimas antioxidantes preservadas durante o cultivo para as duas linhagens. No ensaio *in situ*, foi verificado que os fragmentos de tecido do GC, GE1 e GE2 apresentaram marcação semelhante para proliferação celular nos túbulos renais, diferindo apenas em relação às células glomerulares no dia 4 e intersticiais ( $p < 0,05$ ) no GE1. Já, quanto à marcação para células apoptóticas o GC obteve maiores níveis que o GE1 e o GE2, exceto no dia 8 do GE1. A expressão da angiogênese não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos, no interstício e túbulos renais. No entanto, nos glomérulos e nos vasos peritubulares, a expressão do marcador prevaleceu no GE2. Na análise do estresse oxidativo, o G1 se destacou, com altos níveis de TBARS e nitrito, com baixa atividade das enzimas antioxidantes ( $p < 0,05$ ). Ainda, quanto aos danos ao DNA, nos animais do GE1 apresentaram maior frequência e índice comparados aos do GC negativo e GE2, com uma redução durante os dias no GE2. Com base nos achados desta pesquisa, as células-tronco mesenquimais e progenitoras renais apresentaram-se satisfatórias na passagem precoce *in vitro* e com melhores resultados na regeneração renal *in situ* quando comparados aos suínos não tratados. Ademais, referentemente ao estresse oxidativo e ao dano ao DNA, os ensaios com células progenitoras renais, demonstraram maior eficácia.

**Palavras-chave:** Nefropatia, Células-tronco, Estresse oxidativo, Danos ao DNA, Regeneração

## ABSTRACT

Therapy with mesenchymal stem cells (MSC) and renal progenitor cells (RPC) has shown increasing interest because of their potential regenerative and immunosuppressive capacity in various nephropathies, including renal ischemia-reperfusion injury (IRI). However, for the clinical application of these cells there must be extensive safety with studies aimed at maintaining the conditions of culture during its expansion and with observance in experimental clinical trials. The objective of this study was to evaluate oxidative stress and DNA damage in situ and in vitro, cell proliferation and apoptosis, and angiogenesis, in the treatment of kidney injury in pigs. MSC of the bone marrow and CPR of the renal cortex of pigs were used using early, therapeutic and late passages to analyze the culture during the expansion. For in situ evaluation, 15 pigs were submitted to IRI by surgical induction and received cell therapy, in which they were divided into three groups: Control (GC), treatment with MSC (GE1) and RPC (GE2). Renal tissue fragments were collected by serial biopsies for analysis of cell proliferation, apoptosis and angiogenesis by immunohistochemistry, evaluation of DNA damage by the comet assay, and oxidative stress by measuring levels of lipid peroxidation (TBARS), nitrite and activity of antioxidant enzymes (reduced glutathione-GSH and catalase). The statistical analysis of the data was performed using the Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Tuckey and Neuman-Keuls test. In the immunophenotypic characterization of MSC, the CD14-, CD24-, CD133-, CD905 +, CD90 +, CD106 + and CD140b + markers were observed, and CD14-, CD24-, CD133 +, CD155 +, CD90 +, CD106 + and CD140b + were obtained for RPC. The cell viability curve was extended up to day 15 for RPC and day 21 for MSC. Both lines presented the initial passage with high level of apoptosis and low necrosis, with inversion in the therapeutic passage, and high levels in the late one. The early passage of MSC and RPC indicated a lower rate of damage than the therapeutic and late phase. The RPC passages expressed low levels of lipid peroxidation and nitrite when compared to MSC, and activity of antioxidant enzymes preserved during cultivation for both strains. In the in situ assay, CG, GE1 and GE2 animals showed similar marking for cell proliferation in the renal tubules, differing only in day 4 and interstitial glomerular cells ( $p < 0.05$ ) in GE1. Already, regarding the measurement of apoptotic cells the GC obtained higher levels than GE1 and GE2, except on day 8 of GE1. The expression of angiogenesis did not show a significant statistical difference between the groups in the interstitium and renal tubules; however, in the glomeruli and in the peritubular vessels, the expression of the marker prevailed in GE2. In the analysis of oxidative stress, G1 stood out, with high levels of TBARS and nitrite with low activity of antioxidant enzymes ( $p < 0.05$ ). Also, for DNA damage, in GE1 animals presented higher frequency and index compared to GC negative and GE2, with a reduction during the days in GE2. Based on the findings of this research, the mesenchymal and renal progenitor stem cells were satisfactory at the early passage in vitro and with better results in renal regeneration in situ when compared to the untreated pigs. In addition, to oxidative stress and DNA damage, renal progenitor cell assays have been shown to be more effective.

**Keywords:** Nephropathy, Stem Cells, Oxidative Stress, DNA Damage, Regeneration



## INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

As células-tronco constituem importante promessa para terapia celular, engenharia de tecidos e medicina regenerativa, bem como para aplicações farmacêuticas e biotecnológicas. Apresentam capacidade de se auto-renovar e se diferenciar em tipos de células especializados, dependendo de sua fonte de obtenção. O uso dessas células para aplicações clínicas requer alta qualidade e quantidade de células (MCKEE; CHAUDHRY, 2017). As Células-Tronco Mesenquimais (CTM) foram descobertas no início dos anos 90 e, mais de uma década depois, os critérios para a definição de CTM foram divulgados pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (ANDRZEJEWSKA, LUKOMSKA, JANOWSKI; 2019).

As CTM são obtidas de uma variedade de tecidos, possuem facilidade no isolamento, aderem facilmente a frascos de cultura de plástico, expandem-se *in vitro* e tem a capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares com potencial de regeneração e plasticidade promissoras, com descobertas recentes para o progresso de métodos de diferenciação celular (HILL et al, 2019; SI et al., 2019). Tais condições de cultura fizeram das CTM um objeto de pesquisa atraente com relatos de estudos pré-clínicos sobre propriedades potencialmente terapêuticas de CTM, como imunomodulação, suporte trófico e capacidade de diferenciação espontânea em células do tecido conjuntivo e na maioria dos tipos de células em condições indutivas específicas (ANDRZEJEWSKA, LUKOMSKA, JANOWSKI; 2019).

Segundo Torre et al., (2014), as CTM como um produto de terapia avançada deve obedecer os requisitos para sua utilização em humanos, com o objetivo de manter a qualidade e a segurança das células, exigindo que as preparações de células sejam produzidas e controladas, desde a coleta e manipulação até sua aplicação. Cornélio; Medeiros (2014) relatam que o uso dessas células precisa de validações com testes laboratoriais para sua aplicação clínica tendo em vista que existem ambiguidades substanciais e incertezas na literatura sobre a estabilidade genética dessas células durante a expansão *in vitro* e antes da implantação no paciente.

As CTM podem ter riscos de alterações genéticas, e a triagem genética é um pré-requisito para sua utilização terapêutica (ROEMELING-VAN RHIJN et al., 2013). Para Lambert et al. (2011), a manutenção rigorosa da estabilidade genômica em células-tronco por meio de defesas anti-estresse e mecanismos de reparo de DNA é particularmente importante, pois qualquer alteração genética pode comprometer a estabilidade genômica e a funcionalidade da célula.

Para alcançar resultados positivos na aplicação clínica, é importante obter um alto número de células, para os quais, a maioria dos protocolos clínicos recomenda  $20-100 \times 10^6$  células que são obtidas por expansão (SAREEN et al., 2018). A cultura de longo prazo promove mudanças contínuas nas CTM com possível acúmulo de estresse oxidativo e a desregulação dos principais fatores de diferenciação indicando o maior comprometimento das CTM senescentes (TURINETTO; VITALE; GIACHINO, 2016). O envelhecimento e a senescência estão associados a um maior estresse oxidativo, que limita o número de vezes que as CTM podem ser passadas e a qualidade dessas células (DENU; HEMATTI, 2016).

Vários mecanismos anti-oxidantes e anti-estresse de células-tronco foram caracterizados e o foco tem sido nos efeitos adversos das EROs (espécies reativas de oxigênio), particularmente os efeitos danosos do acúmulo de EROs no envelhecimento dos tecidos e o desenvolvimento de câncer (KOBAYASHI; SUDA; 2012). A geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERN) ocorre durante procedimentos inflamatórios, na isquemia celular e em vários processos cruciais de desenvolvimento, como a diferenciação celular e ao longo das vias de sinalização celular (JHA et al., 2017). As EROs e ERNs incluem duas classes de moléculas quimicamente reativas contendo oxigênio (espécies reativas de oxigênio, EROs) que produz radicais livres tais como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $^{\cdot}OH$ ); e nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio, ERN) produzindo óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) (WEIDINGER; KOZLOV; 2015).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) que agem como a primeira linha de defesa nos mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Quando ocorrem desequilíbrios redox com aumento de radicais livres e redução nas vias antioxidantes, o resultado é a oxidação de lipídios (lipoperoxidação), proteínas (carbonilação e/ou nitração), carboidratos (carbonilação) e DNA (oxidação de bases nitrogenadas), ocorrendo assim, o estresse oxidativo (BIRCH-MACHIN; BOWMAN, 2016; KESHARI et al., 2015).

As CTM são conhecidas por terem baixos níveis de EROs intracelulares e altos níveis de glutathione, um antioxidante chave, também expressando constitutivamente altos níveis de enzimas necessárias para controlar o estresse oxidativo (ATASHI; MODARRESSI; PEPPER, 2015). O aumento de enzimas como glutathione redutase (GSR), superóxido dismutase (SOD) e

catalase (CAT) são observadas com maior evidência durante o processo de diferenciação celular induzida pelas mudanças oxidativas durante os dias de cultivo de CTM (DREHMER et al., 2016; ALLAMEH et al., 2018).

Embora as EROs estejam envolvidas em uma ampla gama de processos celulares, um número limitado de estudos examinou a complexa geração e a função de EROs em células-tronco (CIEŚLAR-POBUDA et al., 2017). Uma alternativa para medição do estresse oxidativo de CTM em diferentes passagens de cultura tem sido a medição de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (SPRADA et al., 2015). O método determina as concentrações de MDA (malondialdeído) que é um dos mais frequentemente medidos biomarcadores do estresse oxidativo, ou seja, de peroxidação lipídica (TSIKAS et al., 2017).

A estimativa dos níveis de óxido nítrico é realizada por meio da quantificação sérica de nitrito, um produto de degradação do NO que apresenta boa sensibilidade e estabilidade (PIRES et al., 2013). O NO produzido pelas CTM é um dos principais mediadores no papel imunossupressor com regulação de células T (MA et al., 2014; SATO et al., 2007). Porém, em concentrações elevadas de NO e seus derivados (peroxinitrito, dióxido de nitrogênio ou nitrosotióis) interferem na respiração mitocondrial com inibição irreversível da cadeia respiratória, desacoplamento, transição de permeabilidade e/ou morte celular (PODEROSO; HELFENBERGER; PODEROSO, 2019).

Durante a expansão *in vitro*, as CTM em longo tempo de cultura senescentes têm sido associadas ao dano macromolecular e, especialmente, ao dano ao DNA induzido pelo estresse oxidativo (TRACHANA et al., 2017). As CTM comumente apresentam alta resistência a danos no DNA, o que depende dos seus mecanismos de reparo, como sua capacidade limitada de realizar o reparo de quebras de DNA de fita dupla durante sua expansão *ex vivo*. (OLIVER et al., 2013, HARE et al., 2016). A sensibilidade das células-tronco adultas não-hematopoiéticas ao estresse genotóxico depende da taxa de proliferação e da capacidade regenerativa do tecido de origem, no qual tecidos altamente proliferativos são sensíveis a danos no DNA e por outro lado, as lentamente proliferativas ou quiescentes apresentam uma resistência aumentada aos agentes que danificam o DNA (VITALE et al., 2017).

As células obtidas a partir dos tecidos de rim vêm ganhando notoriedade nas pesquisas para tratamentos das nefropatias, como as Células Progenitoras Renais (CPR) (BUSSOLATI et al., 2015; GRANGE et al., 2014). Estudos utilizando células progenitoras da cápsula de

Bowman, glomérulos, túbulos proximais, e papila renal, expressaram vários marcadores de células-tronco, como CD24, CD133, CD106, vimentina e Pax-2 têm alto potencial clonogênico, capacidade de auto-renovação, e se diferenciar em linhagens de células renais específicas, o que sugere uma fonte potencial terapêutica para a regeneração renal (CHUNG et al., 2015).

Angelotti et al., (2012) relatam a diferença de expressão de marcadores que inferem na localização das células no rim e nos mecanismos que envolvem na terapia celular, como por exemplo, as populações de células CD133 + CD24 + CD106+, localizadas no pólo renal, possuem uma alta taxa de proliferação e podem diferenciar-se em podócitos, enquanto uma população distinta de células CD133+ CD24+ CD106- são dispersas no túbulo proximal, bem como no túbulo contorcido distal, com menor capacidade proliferativa e com fenótipo comprometido com a linhagem tubular. Este mesmo autor relata que na lesão renal aguda (LRA), as populações exibem a capacidade de adentrarem ao rim, gerar novas células tubulares e melhorar a função renal.

A doença renal é um problema de importância mundial com altas taxas de morbidade e mortalidade, dentre elas insuficiência renal tem opções de tratamento atuais limitadas a diálise e transplante de rins (MOON et al., 2016). O transplante tem sido a alternativa mais custo-efetiva dentre as terapias de substituição renal (GUERRA JUNIOR et al., 2010). A lesão por isquemia e reperfusão renal (IRR) é uma consequência relevante e inevitável após o transplante renal e influencia no resultado do enxerto em curto prazo, bem como em longo prazo (SALVADORI; ROSSO; BERTONI; 2015).

O mecanismo de lesão de isquemia-reperfusão é bastante complexo e envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), inflamação, apoptose e necrose, tendo como consequência principal a necrose tubular aguda pós-isquêmica (SCHROPPEL; LEGENDRE, 2014; KEZIC et al., 2016).

No pós-transplante, a IRR pode ser distinta da isquemia fria e quente, e uma fase de reperfusão (reoxigenação) durante a qual ocorrem diferentes reações celulares (MENKE et al., 2014). O tempo de isquemia quente é definido pelo período entre o clampeamento da artéria no doador até a perfusão com solução de preservação. Esse é o período em que o dano celular é mais evidente (REQUIÃO-MOURA et al., 2015).

Nas primeiras horas após a IRR, a insuficiência renal aguda representa o maior evento clínico em que inicialmente encontram-se os danos causados pela hipóxia nas células tubulares

(MENEZES et al., 2010; ALFARANO et al., 2012). A IRR grave resulta em uma alteração permanente da densidade capilar renal e dano permanente aos capilares peritubulares, contribuindo para um defeito na concentração urinária e a predisposição para o desenvolvimento de doença renal crônica (BASILE et al., 2018).

Os estágios iniciais da IRR parecem estar associados a uma resposta anti-angiogênica, enquanto a hipóxia que segue a IRR em fases posteriores pode ativar fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e pode ser benéfica pela estabilização da microvasculatura e favorecimento do suprimento sanguíneo local (PALLET et al., 2014).

A forma mais comum de LRA é a necrose tubular aguda (NTA), caracterizada pela morte das células epiteliais tubulares e disfunção em um ou vários segmentos tubulares (ENDRE et al., 2013). Além da NTA, a apoptose tubular contribui para o desenvolvimento de lesão renal aguda isquêmica (WEI et al., 2010). Na lesão por IRR, a apoptose é caracterizada pela fragmentação do DNA e danos inter-nucleosomais da mitocôndria causados por EROs (LIU et al., 2015).

A reperfusão é a principal responsável pelas lesões nas células do órgão isquemiado (YAMAKI et al., 2012). Os fenômenos da reperfusão consistem em eventos que "paradoxalmente" continuam a danificar o tecido, apesar da circulação estabelecida e do suprimento de oxigênio para o tecido que anteriormente estava sob isquemia (KEZIC et al., 2016). A lesão hipóxica e reperfusão inicial conduz à ativação de respostas imunitárias, o que resulta em danos aos tecidos. Após a lesão, um processo de reparação envolvendo proliferação celular deve ocorrer para recuperar a função renal (BANAEI, 2015). Contudo, a lesão de reperfusão é multifatorial e em parte atribuída à rápida reoxigenação dos tecidos em hipóxia, resultando em dano oxidativo e sobrecarga de cálcio por causa da perda da homeostase bomba de íons (SHARFUDDIN; MOLITORIS, 2011).

A lesão do tecido renal durante a IRR ocorre como resultado da peroxidação dos lipídios da membrana, dano oxidativo das proteínas e do DNA e resulta em apoptose e necrose (SOLATI et al., 2016). O aumento do óxido nítrico via atividade da iNOS (óxido nítrico-sintase induzida) durante a isquemia renal é prejudicial ao rim e à inibição da iNOS, resultando no alívio da lesão tubular renal e melhorias estruturais e funcionais (MALEK; NEMATBAKSH; 2015; NOIRI et al., 2018).

Para Banaei (2015), a produção de radicais livres implica na morte celular por necrose e por apoptose em IRR. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal

fonte geradora de radicais livres (BARBOSA et al., 2010). Segundo Sureshbabu; Ryter; Choi, (2015), o fato de o rim ser rico em mitocôndrias indica que é altamente vulnerável a danos causados pelo estresse oxidativo. No rim, a lesão de reperfusão e produção de radicais livres desempenham um papel prejudicial na fisiopatologia da rejeição de aloenxertos aguda e função renal em fase de pós-transplantação inicial (AIELLO et., 2011).

Terapias baseadas em células-tronco mesenquimais (CTM) têm inúmeras vantagens em ajudar a reparar tecidos inflamados e danificados e estão sendo consideradas como uma nova alternativa para o tratamento de lesões renais (FURUICHI et al., 2012; LIU et al., 2012; BIANCHI et al., 2014). Incluem-se a reparação renal e seus efeitos importantes sobre o sistema imune inata e adaptativa, com propriedades anti-inflamatórias notáveis que a tornam atrativas para uso potencial em doenças autoimunes como o transplante renal (REINDERS et al., 2010). Essas células podem atuar por mecanismos independentes na renoproteção com propriedades: anti-inflamatória, pró-angiogênica, anti-apoptótica, anti-fibrótica, anti-oxidante, promotoras da reprogramação celular e estimulação de células progenitoras endógenas (ALMEIDA et al., 2013).

Pesquisas evidenciam os efeitos positivos do uso de CTM no reparo da lesão renal após a IRR providenciando o estímulo da proliferação celular tubular, mecanismos de angiogênese e remodelação vascular, redução de apoptose e necrose tubular aguda, diminuição do estresse oxidativo e respostas pró-inflamatórias (FURUICHI et al., 2012; LIU et al., 2012; CHEN et al., 2011). Para Chen et al. (2011) a maioria dos estudos concentra-se na investigação de um mecanismo particular, em vez de um quadro completo, e que os mecanismos reais subjacentes à melhora da função renal após a terapia com CTM poderiam ser ainda mais complexos.

Experimentos com CTM têm sido realizados, por um longo tempo, em diferentes áreas da medicina veterinária (CARRADE; BORJESSON, 2013). Os suínos, no que diz respeito às suas características, constituem como um dos melhores modelos animais para estudos cirúrgicos, especialmente para o transplante renal (GOLRIZ et al., 2012). Resultados promissores são apresentados em pesquisas utilizando CTM em suínos para o tratamento de lesões renais (EIRIN et al., 2012; ZHUO et al., 2013; BAULIER et al., 2014). Para Baulier et al. (2014) em modelo pré-clínico de autotransplante para IRR em suíno, a infusão de CTM apresentou resultado benéficos relativos à verificação da fibrose renal e inflamação crônica. Já, para o tratamento de IRR, Brunswig-Spickenheier et al. (2010) relatam que a utilização de CTM não proporciona

melhoria da função renal e nem efeito modulador sobre a inflamação. Bezerra (2018), ao realizar estudo clínico quanto ao uso de células tronco mesenquimais da medula óssea e células progenitoras heterogêneas do córtex renal no tratamento de IRR em suínos, indica que em relação às alterações histológicas e a imunomodulação as células progenitoras renais promovem melhor efeito renoprotetor.

Em modelos de lesão IRR induzida em suínos, os estudos são escassos quanto ao uso de CPR na melhoria da regeneração tubular associado ao estresse oxidativo e ao potencial genoprotetor. Considerando que a terapia com célula-tronco é questionada quanto a sua integridade genômica com apresentação de danos ao DNA durante sua expansão da cultura, o alto nível de EROS com aumento estresse oxidativo nas lesões de IRR pode se tornar um agravante para induzir alterações genômicas recorrentes na terapia proposta. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o estresse oxidativo e os danos ao DNA *in vitro* e *in situ* das células-tronco mesenquimais e progenitoras renais, com análise da proliferação, apoptose e angiogênese em suínos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão renal.

Este estudo encontra-se estruturado da seguinte forma: Introdução e Revisão de Literatura, seguindo de 2 capítulos, em acordo com a Resolução 001/03-CCMCA de 22.05.2003, que estabelece as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. O capítulo I trata da **Análise da viabilidade, instabilidade genômica e estresse oxidativo *in vitro* de células tronco mesenquimais e progenitoras renais suínas em diferentes passagens** e o capítulo II se refere ao **Potencial regenerativo, antioxidante e genoprotetor de células progenitoras renais e de células-tronco mesenquimais em lesão do rim de suínos**, ambos elaborados na forma de artigos científicos.

## **CAPÍTULO I\***

\*Apresentado segundo normas do periódico Oxidative Medicine and Cellular Longevity (print)



## Segurança terapêutica de células-tronco mesenquimais e progenitoras renais suínas durante a expansão

Elis Rosélia Dutra de Freitas Siqueira Silva<sup>1</sup> Maria Acelina Martins de Carvalho<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Brasil. elisroselia@hotmail.com*

<sup>2</sup> *Professora Titular, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Brasil. mcelina@ufpi.edu.br*

### RESUMO

As células-tronco mesenquimais são de considerável interesse por serem facilmente cultivadas *in vitro* e por ter demonstrado potencial no tratamento clínico, contudo, sua expansão pode afetar as propriedades biológicas com possíveis mudanças celulares. O objetivo desse estudo foi avaliar o comprometimento celular genético e antioxidante durante a expansão das culturas de células-tronco mesenquimais (CTM) e de progenitoras renais (CPR) suínas. Foram utilizadas CTM da medula óssea e CPR do córtex renal de suínos obtidas por meio do descongelamento junto ao banco de células do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt), utilizando as passagens precoce, terapêutica e tardia. Avaliaram-se as células quanto a sua expressão de marcadores imunofenotípicos, cinética celular, apoptose e necrose, danos ao DNA e estresse oxidativo. A análise de marcadores de CTM apresentou caracterização CD14-, CD24-, CD133-, CD105+, CD90+, CD106+, CD140b+ e CPR com marcação CD14-, CD24-, CD133+, CD155+, CD90+, CD106+, CD140b+. A cinética celular demonstrou viabilidade celular até o dia 15 para CTM e até o dia 21 para CPR. As duas linhagens apresentaram a passagem precoce com alto nível de apoptose e baixo nível de necrose, com inversão na passagem terapêutica, e altos níveis na passagem tardia. A passagem precoce de CTM e CPR indicou resultados satisfatórios na instabilidade genômica, com maior índice de danos na fase terapêutica e tardia. As passagens de CPR expressaram baixos níveis de peroxidação lipídica e nitrito quando comparada a CTM, e atividade de enzimas antioxidantes preservadas durante o cultivo para as duas linhagens. A passagem precoce de células-tronco mesenquimais e progenitoras renais obteve adequada viabilidade, defesa antioxidante e estabilidade genética durante sua expansão celular, com resultados melhor observados para CPR.

**Palavras-chave:** cultivo celular; dano ao DNA; sistemas antioxidantes; peroxidação lipídica; expansão celular.

## 1. INTRODUÇÃO

36  
37

38 O cultivo de células-tronco é uma área de intensa atividade e indispensáveis para uma  
39 variedade de estudos [1]. As células-tronco mesenquimais (CTM) são de considerável interesse  
40 por serem facilmente cultivadas *in vitro*, podendo ser isoladas de vários tecidos e possuir  
41 características biológicas que conferem alta aplicabilidade em tratamento clínico [2]. Para  
42 alcançar resultados positivos na aplicação clínica, é importante obter um alto número de células,  
43 para os quais, a maioria dos protocolos clínicos recomenda 20-100 × 10<sup>6</sup> células por tratamento e  
44 para obter um número tão alto de células as CTM precisam ser expandidas *in vitro* por pelo  
45 menos de 4 a 8 semanas antes do transplante, que correspondem as passagens mais utilizadas, de  
46 P3 à P7 [3,4]. As condições da cultura não são totalmente fisiológicas, podendo afetar as  
47 propriedades biológicas das CTM com possíveis mudanças celulares que possam surgir durante a  
48 expansão celular [4].

49 É importante melhorar o ambiente da cultura extrínseca das CTM, como controle do  
50 estresse oxidativo na cultura, para reter o fenótipo das células expandidas e retardar o processo  
51 de senescência antes de sua aplicação clínica [5]. O estresse oxidativo resultante do aumento da  
52 produção de espécies reativas de oxigênio e da falha dos sistemas de eliminação de radicais  
53 livres podem ocasionar graves danos às macromoléculas biológicas, afetando a proliferação  
54 celular e causando instabilidade genômica [6]. Estudos em diferentes passagens de CTM *in vitro*  
55 têm avaliado a mudança de comportamento das mesmas com alterações nos níveis de estresse  
56 oxidativo e instabilidade genômica, principalmente em passagens de longo tempo. Contudo,  
57 diferentes resultados são encontrados de acordo com as fontes de obtenção dessas células, bem  
58 como as demais linhagens celulares que são inestimáveis para pesquisa básica e aplicações  
59 terapêuticas [5,7,8,9].

60 As células-tronco ou progenitoras renais (CPR) têm efeitos benéficos para melhor  
61 resultados no enxerto e diferenciação renal, contudo, um consenso ainda não foi alcançado em  
62 relação à identificação dessas células [10]. Além disso, faz-se necessário o estudo dessas células  
63 ao longo do cultivo para melhor elucidar seu comportamento, como sua responsividade ao  
64 estresse oxidativo e a instabilidade genômica, como alternativa segura no tratamento de doenças  
65 renais. Dentre os estudos com terapia celular em lesões renais, o suíno é o animal de escolha

66 como modelo experimental devido às suas semelhanças fisiológicas e anatômicas com humanos  
67 [11,12].

68 Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a cultura de células tronco mesenquimais e  
69 progenitoras renais suínas quanto à viabilidade, instabilidade genômica e estresse oxidativo em  
70 diferentes passagens de cultivo.

71

## 72 **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

73

### 74 **2.1 Obtenção de CTM e CPR**

75 As células-tronco mesenquimais da medula óssea e células progenitoras do córtex renal de  
76 suínos foram obtidas junto ao banco de células do Laboratório de Cultivo Celular (LABCelt) do  
77 Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt), por meio do  
78 descongelamento, seguindo o protocolo descrito por Bezerra [11].

79 Neste estudo classificaram-se as passagens de CTM conforme sua aplicação clínica  
80 baseado em pesquisas [3,4] que consideram a passagem mais comumente mais utilizada na  
81 clínica médica (P5) e as classificadas como precoce (P2) e tardia (P9) para uso na terapia celular.  
82 Já para as CPR foram classificadas conforme o curto tempo de cultivo e cinética a distinta em  
83 precoce (P1); terapêutica (P2) e tardia (P3).

84

### 85 **2.2 Caracterização imunofenotípica**

86 As CPR em passagem P2 e CTM em P5 foram cultivadas em garrafas de cultivo celular até  
87 obter confluência de 80%, em seguida, foram tripsinizadas, centrifugadas por 10 minutos a  
88 2000rpm e avaliadas quanto à concentração e viabilidade para distribuição em cada tudo com a  
89 concentração de  $2,5 \times 10^5$ . Procedeu-se a lavagem das células com tampão FACS (Separação de  
90 célula ativada por fluorescência) (1 mL) [DBPS (Dubelco's Phosphate Buffer Solution) com  
91 0,1% de BSA (Bovine Serum Albumin)] e centrifugadas 2000 rpm por 10 minutos. Após  
92 desprezar o sobrenadante adicionou os anticorpos com incubação por 30 minutos a temperatura  
93 ambiente. As células foram lavadas com DPBS, centrifugadas e ressuspensas em tampão  
94 FACS (500µL) para análise em citômetro de fluxo FACScanto® II e software BD FACSDiva  
95 software (Version 6.1.3), obtendo-se em torno de 20.000 eventos por amostra testada.

96 As marcações foram realizadas de forma individual por amostra e, ainda para CPR, de  
 97 forma dupla ou tripla, por amostra de acordo com as especificações na Tabela 1, tendo em vista  
 98 os tipos de células presentes no córtex renal, identificadas e utilizadas na regeneração do rim  
 99 [13]. As populações foram estimadas pela porcentagem das células expressando cada um dos  
 100 marcadores em relação ao total de células adquiridas por software INFINICYT (version 5.1).

<b>Anticorpo</b>	<b>Titulação</b>	<b>Cód. Produto</b>	<b>Reatividade</b>	<b>Fluorocromo</b>
<b>CD105</b>	1:100	abcam® 53321	Humano, Suínos	PE
<b>CD90</b>	1:100	abcam®139364	Humano, Caninos, Suínos, Primatas não-humanos	APC
<b>CD14</b>	1:100	abcam® 28061	Humano	FITC
<b>CD133</b>	1:20	eBioscience™ 11133941	Humano	APC
<b>CD140b</b>	1:20	eBioscience™ 17140280	Rato	APC
<b>CD24</b>	1:20	eBioscience™ 63024741	Humano	FITC
<b>CD106</b>	1:20	eBioscience™ 11106181	Rato	FITC

101 Tabela 1. Relação de anticorpos monoclonais conjugados utilizados para caracterização  
 102 imunofenotípica de CPR e CTM suínas por citometria de fluxo.

103

### 104 **2.3 Ensaio de viabilidade por MTT**

105 A cinética celular foi avaliada por meio da curva de crescimento por saturação. As células  
 106 em P2 para CPR e em P5 para CTM foram descongeladas e procedida a contagem, para semear a  
 107 densidade celular de  $7,6 \times 10^3$  células, em placas de 24 poços, em duplicata, com o meio de  
 108 cultura sendo substituído a cada 72 horas. Logo após o descongelamento (d0) foi avaliada a  
 109 viabilidade celular, e a cada 3 dias, dois poços foram escolhidos aleatoriamente e o meio de  
 110 cultivo foi substituído por solução de brometo de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-  
 111 tetrazólio) e D-MEM High Glucose na proporção de 1:9. Após a incubação por 5 horas, o  
 112 sobrenadante foi aspirado, adicionado DMSO (dimetilsulfóxido) (200  $\mu$ l) e mantido por 30  
 113 minutos até sua retirada e remoção da solução para a placa de leitura em espectrofotômetro

114 utilizando comprimento de onda de 550 nm. O procedimento foi executado a cada 72 horas até  
115 completa exaustão da cultura com ausência de células aderidas em cultura observadas em  
116 microscopia óptica. A curva de viabilidade celular foi plotada com os pontos de tempo como os  
117 valores de abscissa e o de densidade ótica como a ordenada.

118

#### 119 **2.4 Análise da apoptose e necrose celular**

120 As células em cultivo após a expansão nas passagens de estudo foram tripsinizadas e  
121 lavadas duas vezes com PBS refrigerado e depois ressuspensas em tampão de ligação 1X a uma  
122 concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml. Em seguida, transferidas 100  $\mu$ l da solução para um tubo e  
123 adicionado 5  $\mu$ l de PE Annexin V e 5  $\mu$ l 7-AAD do kit de detecção I Annexin V : PE Apoptosis  
124 (BD Pharmingen™, nº 559763) com agitação leve e incubadas durante 15 minutos à temperatura  
125 ambiente (25 °C) no escuro. Com a adição complementar de 400  $\mu$ l de tampão de ligação em  
126 cada tubo, foram analisadas por citometria de fluxo em até 1 hora.

127

#### 128 **2.5 Avaliação da instabilidade genética**

129 O ensaio de células individualizadas em gel ou teste de cometa foi realizado em condições  
130 alcalinas (pH > 13), segundo Da Silva et al. [14]. Uma alíquota (10  $\mu$ l) do homogenato a 10%  
131 (*pellet* e tampão fosfato de sódio, pH 7,4) foi misturada com 95  $\mu$ l de agarose com baixo ponto  
132 de fusão a 0,75%. Esta mistura foi então homogeneizada e transferida para lâminas pré-revestidas  
133 com 5% de agarose. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas permitindo  
134 solidificar a 30 °C durante 20 minutos, mantendo-as na horizontal. As lamínulas foram  
135 removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise (2,5 M/L NaCl, 100 mM/L EDTA, 10  
136 mM/L Tris-HCl, pH 10-12, 1% Triton X-100, e 10% DMSO), que foi então resfriado e protegido  
137 da luz por 72 horas sob condição refrigerada (4 °C).

138 Para a desnaturação do DNA, as lâminas foram colocadas numa cuba de eletroforese,  
139 contendo uma solução tampão (30 mM/L NaOH e 1 mM/L de EDTA, pH 13) a 30 °C durante 20  
140 minutos no escuro. A eletroforese foi então realizada a 25V e 300 mA. As lâminas foram então  
141 neutralizadas (400 mM Tris, pH 7.5), durante 3 ciclos de 5 minutos cada. Em seguida, lavadas  
142 com água destilada e submetidas secagem em temperatura ambiente, seguindo-se o tratamento  
143 com solução de fixação contendo 15% (p/v) de ácido tricloroacético, 5% (p/v) de sulfato de  
144 zinco e 5% (p/v) glicerol, durante 10 minutos.

145 Após repetição da lavagem e secagem, as lâminas foram hidratadas durante 5 minutos  
146 com água destilada para coloração com: 34 mL de solução B contendo 0,2% (p/v) de nitrato de  
147 amônio, 0,2% (p/v) de nitrato de prata, 5% (p/v) de ácido tungstosilícico, 0,15% (p/v)  
148 formaldeído e 5% (p/v) de carbonato de sódio e 66 mL de solução A com 5% (p/v) de carbonato  
149 de sódio por 30 minutos a 37 °C com proteção da luz. Após o processo de coloração, a lavagem  
150 final foi feita com água destilada.

151 A leitura das lâminas foi realizada em ensaio as cegas no microscópio óptico num  
152 aumento de 400x, contabilizando 100 células por animal. A avaliação seguiu os métodos de  
153 Carvalho et al. [15] para calcular a frequência de dano (FD) com base no número de células com  
154 ou sem cauda e o índice de dano (ID) em que as células foram visualmente alocadas em cinco  
155 classes de acordo com o tamanho da cauda (0 = sem caudas e 4 = caudas de comprimento  
156 máximo) em um único escore de dano ao DNA para cada amostra e conseqüentemente para cada  
157 grupo estudado, podendo variar de 0 (completamente sem danos = 100 células × 0) a 400 (dano  
158 máximo = 100 células × 4).

159

## 160 **2.6 Níveis de Substâncias Reativas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

161 Os teores de Malondialdeído (MDA) foram determinados pela produção de TBARS,  
162 conforme método de Draper; Hadley [16]. O homogenato a 10% (250 µL) previamente  
163 preparado, foi adicionado em um tubo e agitado juntamente com o ácido tricloroacético 10% (1  
164 mL) e solução de ácido tiobarbitúrico 0,67% (1 mL). Posteriormente, essa mistura foi mantida  
165 em um banho de água fervente por 15 minutos, e, em seguida, resfriada em água corrente. Após  
166 o resfriamento, a mistura foi centrifugada com n-butanol (2 mL) a 1200rpm por 5 minutos. A  
167 fase butanólica de coloração rosa foi medida pela leitura em espectrofotômetro a 535 nm. A  
168 concentração de proteína foi determinada de acordo com o trabalho de Lowry et al. [17]. Os  
169 resultados foram expressos em nM/g de *pellet*.

170

## 171 **2.7 Teor de Nitrito**

172 Para a verificação da concentração de nitrito foi usado o método descrito por Green;  
173 Tannenbaum; Goldman [18]. Foi adicionado em um tubo 500 µL do reagente de Gries e 500 µL  
174 do homogenato a 10%, com a leitura realizada em espectrofotômetro a 560 nm.

175

## 176 2.8 Determinação do nível de glutathiona reduzida

177 A determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) é baseada na reação de  
178 Ellman [5,50-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)] de acordo com o método descrito por Sedlak e  
179 Lindsay [19] com algumas modificações. Foram adicionados 400 µL do homogenato a 10%,  
180 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloroacético a 50% num tubo de ensaio. O material  
181 foi agitado e centrifugado a 3.000 rpm por 15 min. Em seguida, 800 µl de tampão Tris-HCl 0,4  
182 M, pH 8,9 e 20 µl de DTNB 0,01 M (ácido 5,5'-ditio-bis- [ácido 2-nitrobenzóico]) foram  
183 adicionados a 400 µl do sobrenadante e após 1 minutos da reação, a absorbância foi registrada  
184 em 412 nm. Os resultados foram expressos em *pellet* U/g.

185

## 186 2.9 Determinação da atividade da catalase

187 Para a determinação da atividade enzimática da catalase foi usado método descrito por  
188 Chance; Maehly [20]. O meio reacional foi preparado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (18 mL), tampão Tris HCl 1 M,  
189 EDTA 5 nM pH 8,0 (1,0 mL) e H<sub>2</sub>O (0,8 mL). Uma alíquota (980 ml) do meio reacional foi  
190 misturada com 20 ul do homogenato 10% e foram incubadas a 37 ° C, em seguida os níveis de  
191 absorvância foram lidos a cada 1 minuto até 6 minutos a 230 nm. A absorbância do meio  
192 reacional, mas sem o homogenato em 230 nm, foi considerada como o branco. A concentração  
193 de proteína foi determinada de acordo com Lowry et al. [17]. Os resultados foram expressos em  
194 mM/min/mg de proteína.

195

## 196 2.10 Análises estatísticas

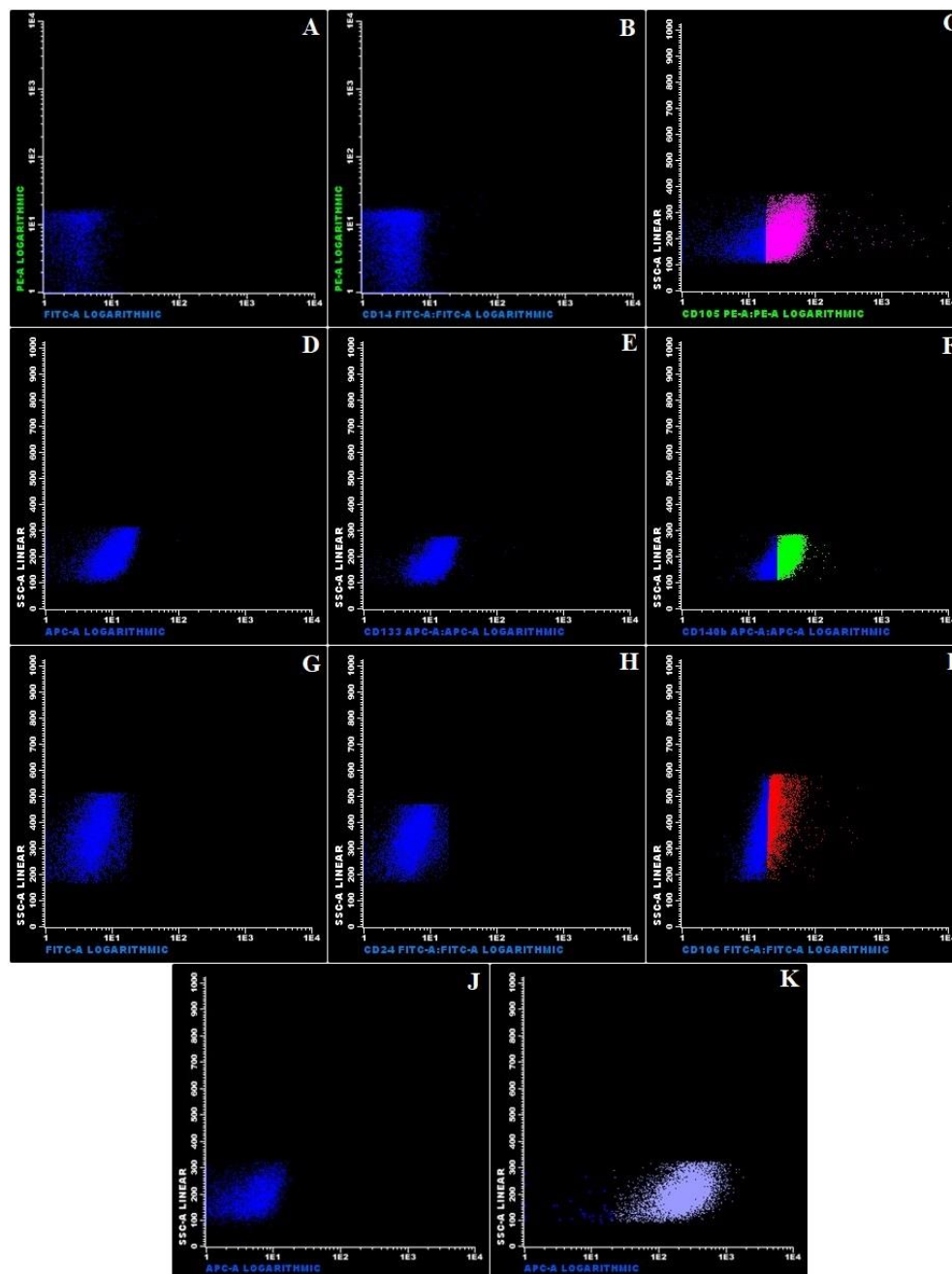
197 Os dados obtidos foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguida do  
198 teste de *Neuman-Keuls* como *post hoc test* utilizando o *software GraphPad Prism 7.0* (San  
199 Diego, CA, EUA). As culturas celulares foram comparadas entre as diferentes passagens e entre  
200 as duas linhagens. As diferenças foram consideradas, estatisticamente, significativas até p<0,05.  
201 Todos os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.).

202

## 203 3. RESULTADOS

204

205 A análise de marcadores de CTM apresentou caracterização imunofenotípica CD14-,  
206 CD24-, CD133-, CD105+, CD90+, CD106+ e CD140b+ (Figura 1).

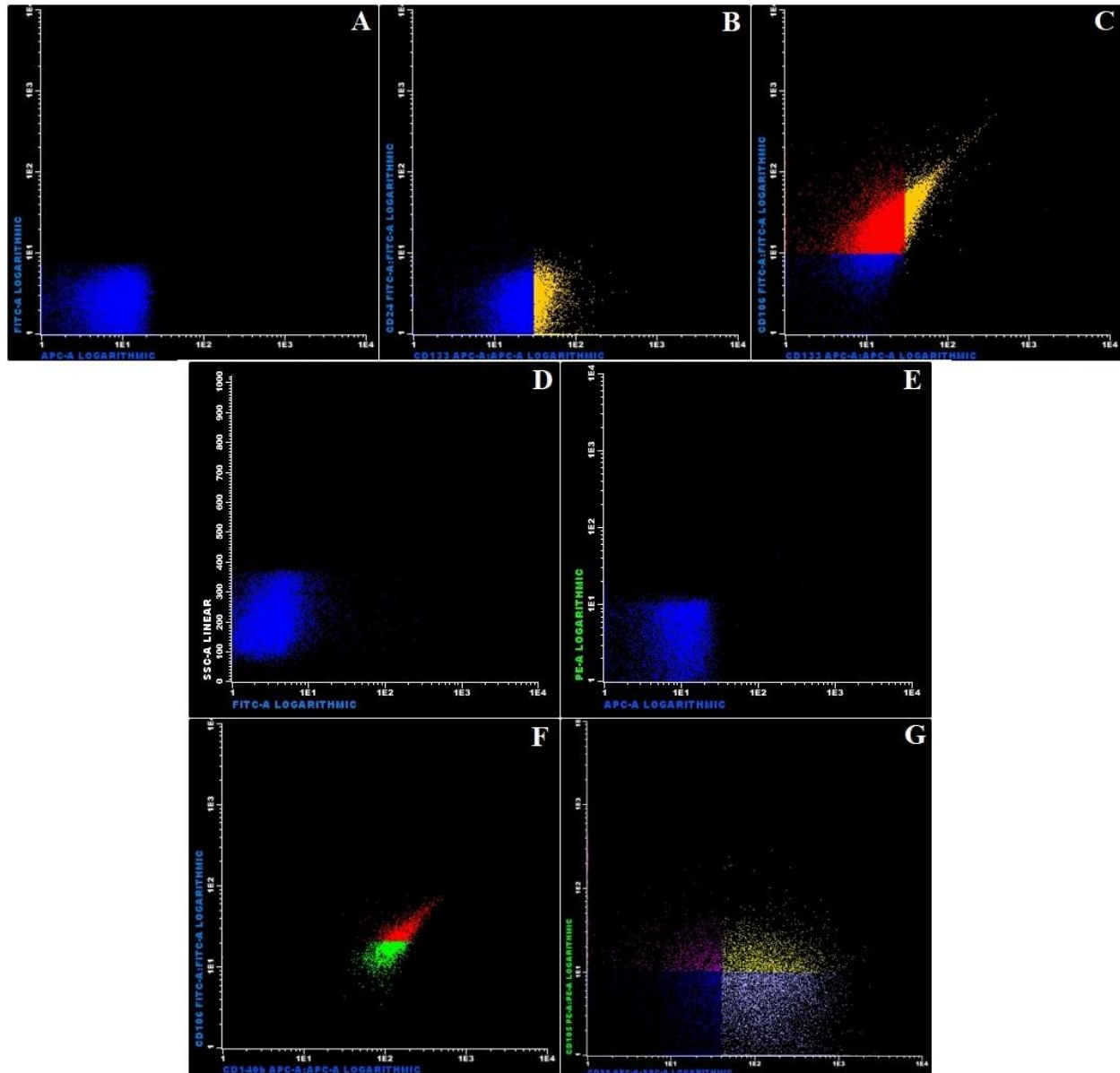


207  
 208 **Figura 1.** Expressão de marcadores para célula-tronco mesenquimal suínas por citometria de  
 209 fluxo. Branco de FITC e APC (A) para CD14- (B) e CD105+ (rosa) (C); Branco de APC (D)  
 210 para CD133- (E) e CD140b+ (verde) (F); Branco (G) de FITC para CD24- (H) e CD106+  
 211 (vermelho) (I); Branco de APC (J) para CD90+ (roxo) (K).  
 212

213 As CPR foram exibiram marcação CD14-, CD24-, CD133+, CD105+, CD90+, CD106+ e  
 214 CD140b+. As células apresentaram marcação na sua totalidade CD14-, CD24- e CD140b+,  
 215 enquanto CD133 (18,69%), CD105 (23,27%), CD90 (78,49%) e CD106 (71,04%) demonstrou  
 216 resultados parciais na expressão de positiva. A análise de forma associada de marcadores,



217 observou-se marcação duplo positivo para a população integral de CD133+ expressando  
 218 CD106+, CD106+ expressando CD140b+, e uma população parcial de CD90+ expressando  
 219 CD105+ (Figura 2). Avaliando-se em porcentagem identificou-se a predominância da marcação  
 220 CD14-/CD24-/CD133+/CD105+/CD90+/CD106+/CD140b+ (49,48%).

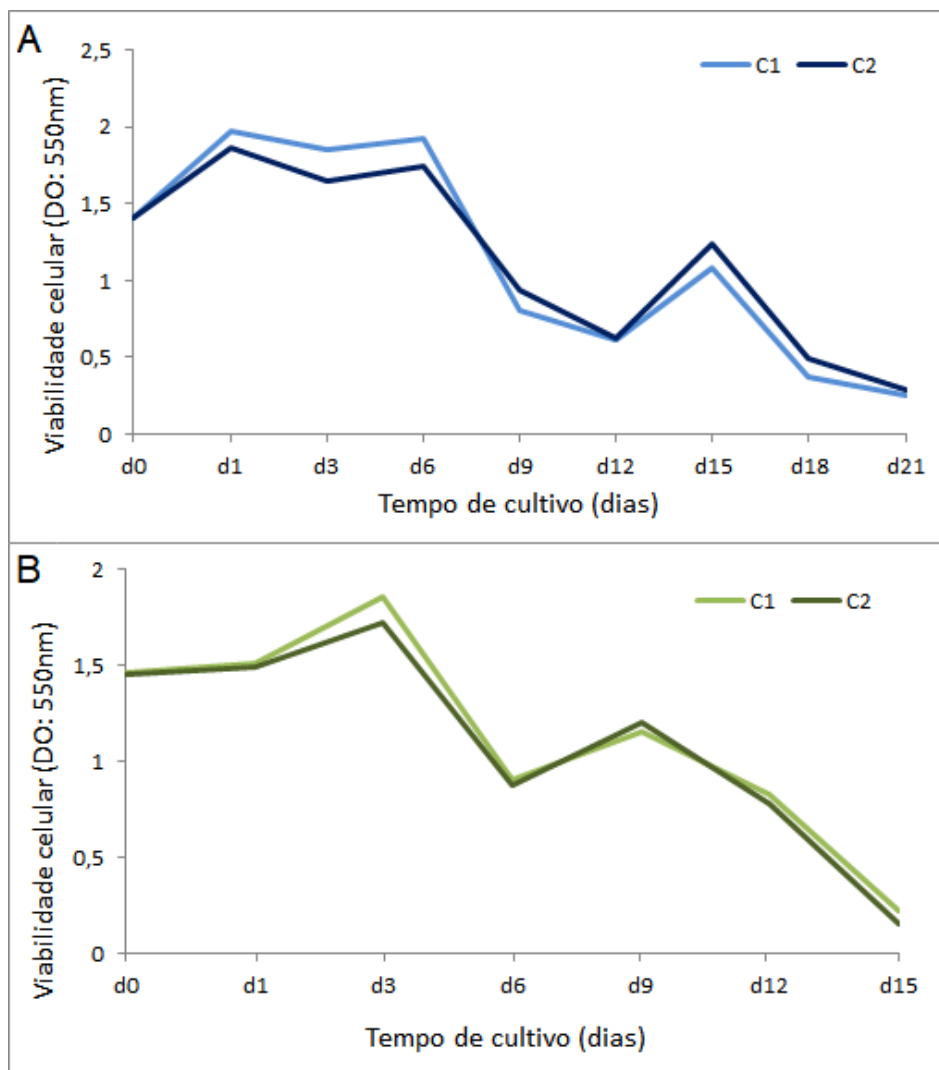


221

222 **Figura 2.** Expressão de marcadores para célula progenitora renal suína por citometria de fluxo.  
 223 Branco de FITC e APC (A) para CD133+ (amarelo) e CD24- (B), CD106+ (vermelho) e  
 224 CD133+/CD106+ (amarelo) (C); Branco de FITC (D) e de APC e PE (E) para CD106+  
 225 /CD140b+ (vermelho) e CD140b+ (verde) (F) e para CD14-, CD90+ (roxo), CD105+ (rosa) e  
 226 CD90+/CD105+ (amarelo) (G).

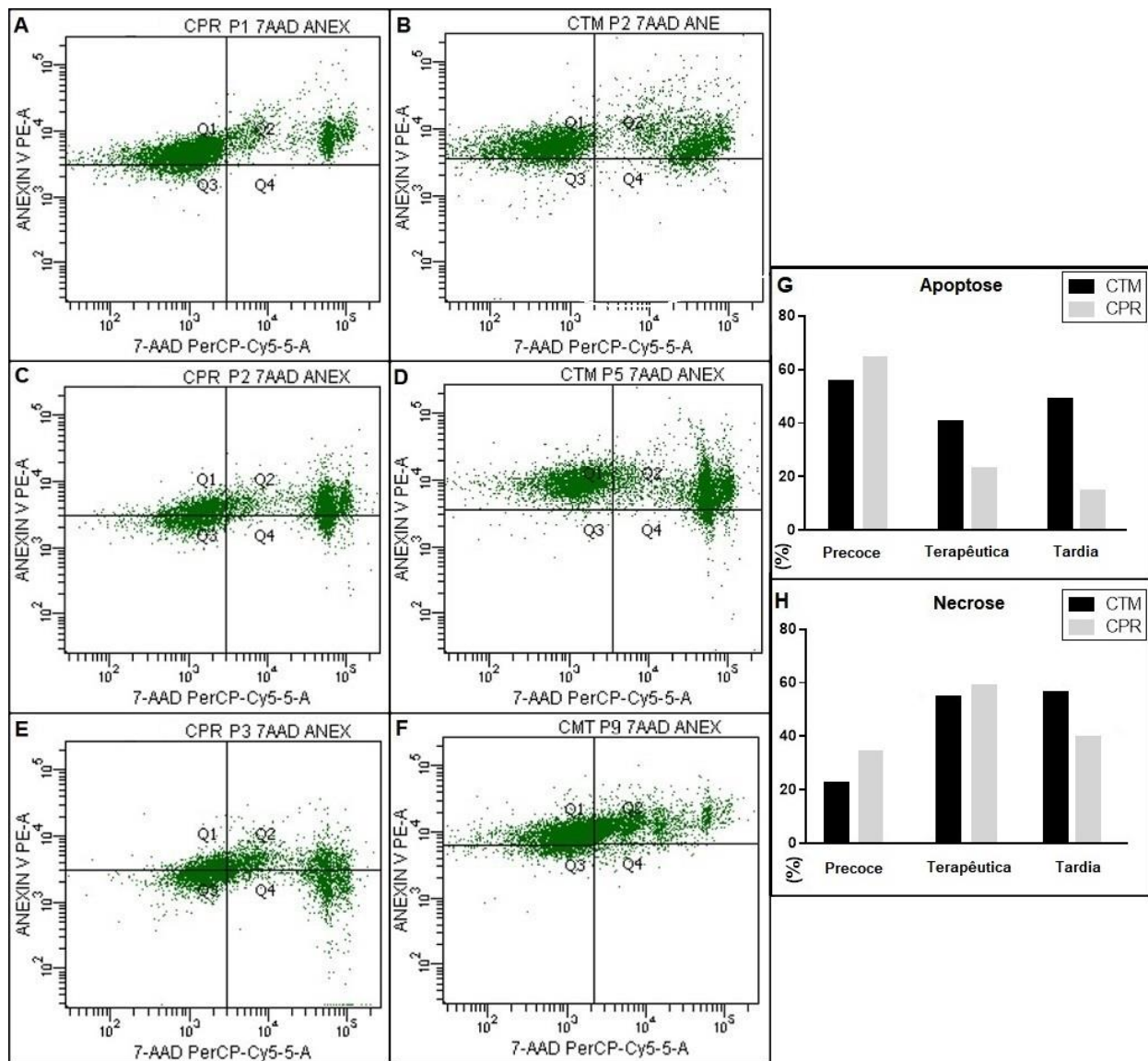
227

228 Na análise da curva de viabilidade pelo teste de MTT para CTM observou-se crescimento  
 229 celular do 3º ao 6º dia e ocorreu um declínio até o 12º dia com um novo aumento no 15º dia e  
 230 posterior declive devido à exaustão do cultivo com morte celular. Na CPR foi possível observar  
 231 um crescimento exponencial até o 3º dia atingindo um *plateau*, seguindo-se de uma fase de  
 232 declínio até o 6º dia com um discreto aumento no 9º dia e posterior declive (Gráfico 1).



233  
 234 **Gráfico 1.** Ensaio colorimétrico de MTT sobre as viabilidades de células-tronco mesenquimais  
 235 (A) e células progenitoras renais (B) suínas.  
 236

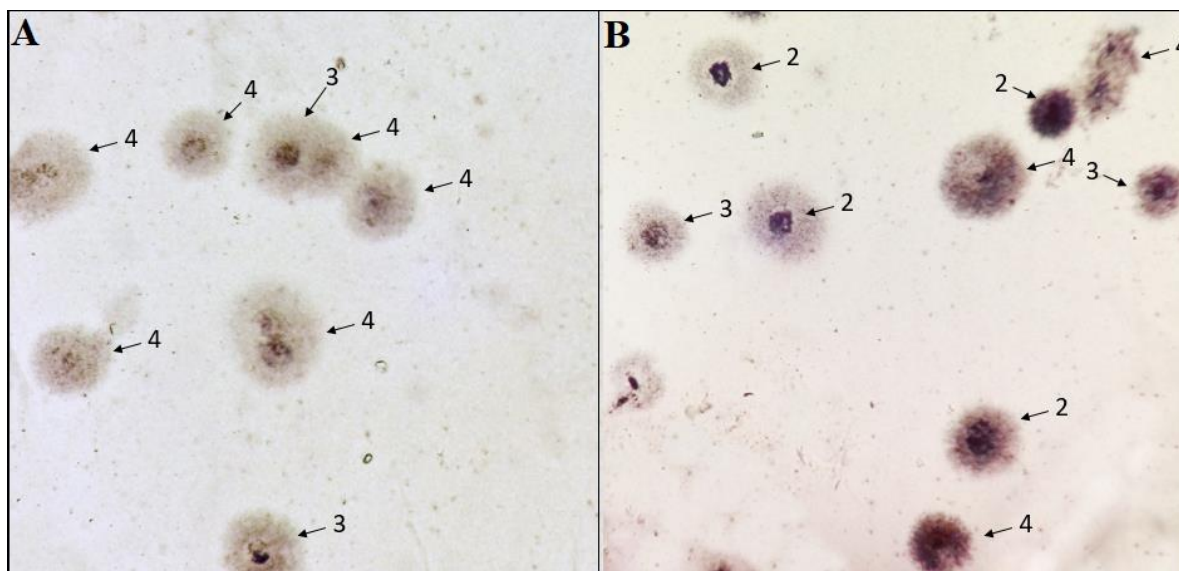
237 Na análise das linhagens ao longo do cultivo celular, ambas apresentaram a passagem  
 238 inicial com alto nível de apoptose e baixo de necrose, na terapêutica observou-se a inversão dos  
 239 resultados com alta necrose e redução de apoptose, e na tardia, alto nível de necrose e apoptose,  
 240 exceto nas CPR com baixos níveis de células em apoptose (Figura 3).



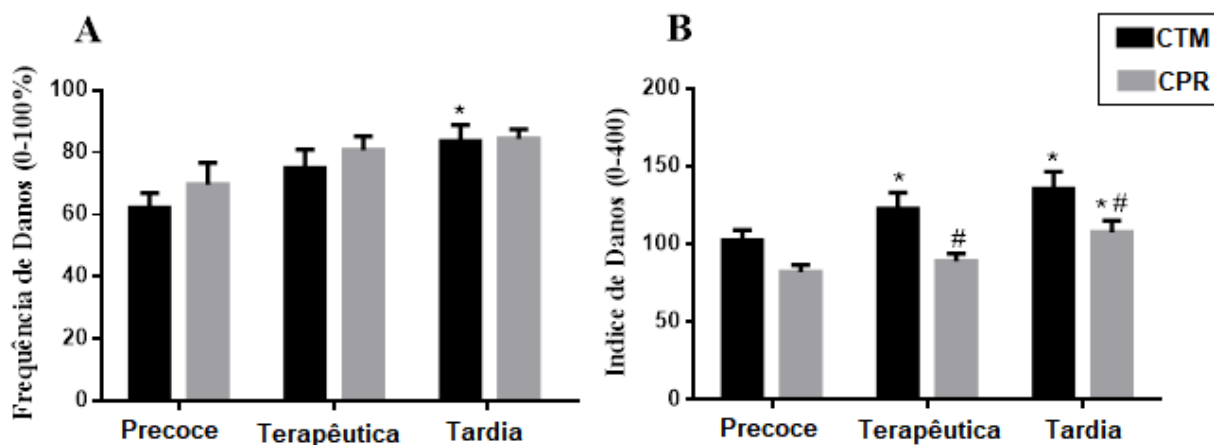
241 **Figura 3.** Análise da expressão de anexina-V(PE)/7-AAD por citometria de fluxo para marcação  
 242 de apoptose/necrose em diferentes passagens de células progenitoras renais (A. precoce; C.  
 243 terapêutica; E. tardia) e células tronco mesenquimais (B. precoce; D. terapêutica; F. tardia)  
 244 suínas com representação gráfica da porcentagem de células em apoptose (G) e em necrose (H).  
 245

246  
 247 Em passagem precoce as CTM e CPR apresentaram estabilidade genômica tanto para  
 248 frequência quanto para e índice de danos. As células não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ )  
 249 entre os tipos e nem quanto as diferentes passagens na frequência de danos ao DNA, com  
 250 exceção da CTM que apresentou mais danos na passagem tardia quando comparada a precoce e  
 251 terapêutica. Já avaliando o índice de danos valores maiores foram observados na CTM  
 252 comparada as CPR, com diferença estatística na passagem terapêutica e tardia ( $p < 0,05$ ) (Figura

253 4). Ainda pode-se visualizar índice de dano aumentado na passagem tardia da CPR quando  
 254 comparado as demais passagens da mesma linhagem ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 2).



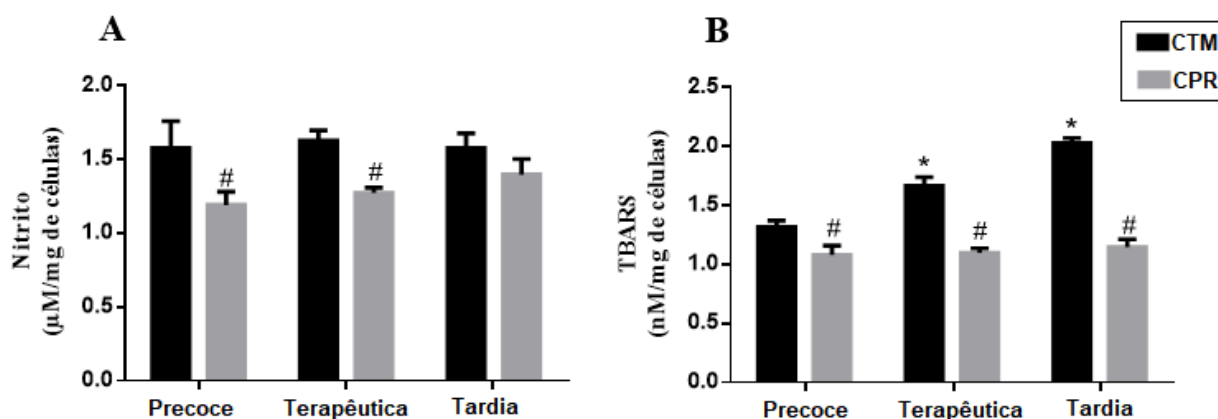
255  
 256 **Figura 4.** Classificação de danos ao DNA na fase tardia (seta 2, 3 e 4) de células-tronco  
 257 mesenquimais (A) e células-progenitoras renais (B) suínas.  
 258



259  
 260 **Gráfico 2.** Avaliação da frequência (A) e índice (B) dos danos ao DNA em células progenitoras  
 261 renais e células-tronco mesenquimais suínas nas diferentes passagens de cultivo. \*diferença entre  
 262 as passagens (comparada a precoce) de cada linhagem; # diferença entre os grupos (comparada a  
 263 CTM) de cada passagem. ANOVA - *Neuman-Keuls*.  $p < 0,05$ .

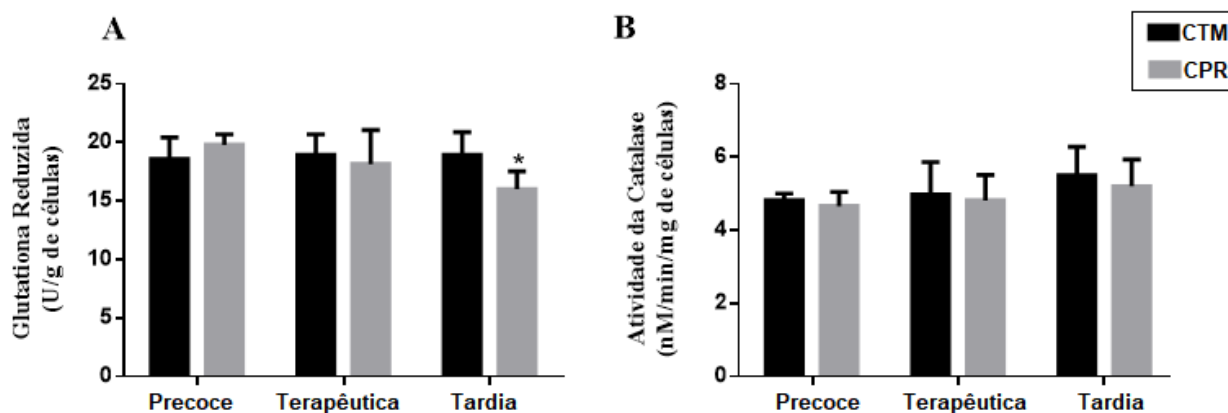
264 O cultivo de CPR manteve níveis de nitrito e TBARS constante durante as passagens e  
 265 quando comparadas as CTM obteve menores teores de nitrito nas passagens precoce e  
 266 terapêutica e de TBARS em todas as passagens ( $p < 0,05$ ). Durante o cultivo de CTM os níveis de  
 267 nitrito apresentaram de forma constante e no TBARS aumentado ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 3).

268



269  
 270 **Gráfico 3.** Mensuração do teor de nitrito (A) e níveis de peroxidação lipídica (B) em células  
 271 progenitoras renais e células-tronco mesenquimais suínas nas diferentes passagens de cultivo.  
 272 \*diferença entre as passagens (comparada a precoce) de cada linhagem; # diferença entre os  
 273 grupos (comparada a CTM) de cada passagem. ANOVA - *Neuman-Keuls*.  $p < 0,05$ .

274 As enzimas antioxidantes mantiveram seus níveis sem alterações significativas entre as  
 275 passagens e linhagens ( $p > 0,05$ ). Pode-se observar apenas uma redução do GSH nas CPR no  
 276 cultivo com passagem tardia reduzida comparada a precoce da CTM ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 4).



277  
 278 **Gráfico 4.** Atividade de enzimas antioxidantes (A. Glutaciona reduzida – GSH; B. Catalase) em  
 279 células progenitoras renais e células tronco mesenquimais suínas nas diferentes passagens de  
 280 cultivo. \*diferença entre as passagens (comparada a precoce) de cada linhagem. ANOVA -  
 281 *Neuman-Keuls*.  $p < 0,05$ .

282

## 283 4. DISCUSSÃO

284

285 A expressão imunofenotípica de células-tronco mesenquimais de medula óssea assemelha  
 286 aos marcadores que são comumente relatadas em outros estudos sendo positivos para CD105 e

287 CD90 e negativo para CD45 e CD14 e eventualmente em outras pesquisas expressão positiva de  
288 CD106, CD140b e negativa para CD24 e CD133 [21,22].

289 Da mesma forma as CPR demonstraram expressão similar de marcadores, exceto para  
290 CD133+ que são confirmadas como progenitoras encontradas em todo rim humano, contudo, não  
291 está claro se as células CD133+ renais encontradas em diferentes espécies representam  
292 populações distintas [10,23]. Pesquisas têm demonstrado dupla marcação CD133+/CD24+ [23-  
293 24], o que não ocorreu nesta pesquisa. Possivelmente, às células que sobreviveram nas culturas  
294 estabelecidas não possuíam este marcador ou perderam sua expressão, tendo em vista que o  
295 CD24+ é uma molécula de superfície usada para identificar diferentes tipos de célula-tronco  
296 humana sendo é expressa por mesênquima metanéfrico não induzido durante a embriogênese  
297 renal [25].

298 O perfil fenotípico destas células converge entre os estudos devido à falta de marcadores  
299 específicos, como observado por Gupta et al. [26] que isolou células-tronco de rins de ratos que  
300 acreditava ser progenitoras originado do túbulo proximal, contudo, expressavam vimentina, Oct4  
301 e Pax-2 e não expressavam CD133 ou CD106. Esse estudo entra em conflito com marcadores de  
302 CPR com a expressão de CD140b para todas as células do cultivo e 18,69% expressando  
303 CD133+, correspondem, respectivamente, a marcadores de perícitos e progenitoras renais o que  
304 sugere a aplicação do termo para “tronco/progenitoras” como relatados em outros estudos que  
305 apresentaram resultados semelhantes [27,28].

306 Dessa forma, permitiu-se identificar células que se comportam como CTM com base na  
307 expressão de 49,48% de marcação CD14-/CD24-/CD133-/CD105-/CD90+/CD106+/CD140b+  
308 uma vez que populações de CTM residem em diferentes compartimentos dos néfrons de rins  
309 adultos [29]. Huling;Yoo [10] menciona a importância das condições de isolamento e cultura  
310 dentre os diferentes protocolos para as células-tronco renais que podem ser inferidas na alteração  
311 desses marcadores o que ocasionou uma população heterogênea de células do córtex renal no  
312 cultivo neste experimento.

313 O ensaio de MTT permitiu identificar células viáveis logo após o descongelamento, e  
314 confirma a possível utilização de células criopreservadas para aplicação direta na terapia [30].  
315 Ademais, durante a expansão da cultura, nota-se o aumento da proliferação celular até o 6º dia  
316 para CTM e até o 3º dia para CPR, com células viáveis respectivamente, até os dias 21 e 15. A  
317 restrição de proliferação das CPR por longos períodos já foi observada por Cummings; Lasker;

318 Lash [31] e Bezerra [11]. Tal fato pode ser devido à incapacidade de manter a imaturidade das  
319 populações *in vitro* que restringe a expansão em longo prazo de vários tipos de células-tronco  
320 epiteliais e também devido ao meio de cultivo utilizado (Defined Keratinocyte-SFM, Gibco™,  
321 n° 10744019) ser ideal para cultivo de CTR não sendo específico para a considerável população  
322 encontrada com marcação similar a CTM [32].

323 A passagem precoce demonstrou melhores resultados quanto a apoptose /necrose celular  
324 nas linhagens deste estudo. O alto nível de apoptose nessa passagem pode ter sido ocasionado  
325 pela alta prolificidade da cultura como observado na curva de viabilidade com altos níveis na  
326 mesma passagem. Tal fato pode ser favorável segundo Liu et al., [33] que identifica um papel  
327 anteriormente desconhecido dos corpos apoptóticos na manutenção da homeostase das CTM e do  
328 tecido lesionado em ambos os contextos fisiológicos e patológicos. A passagem terapêutica  
329 demonstrou ser insatisfatória por apresentar alta quantidade de células mortas similar a passagem  
330 tardia. Prieto et al. [34] determina que a CTM a partir de P3 apresenta um declínio progressivo  
331 com redução da expressão de marcadores de células-tronco, na plasticidade e na resposta  
332 inflamatória.

333 A passagem precoce apresentou-se também favorável quanto ao controle da instabilidade  
334 genômica e comprometidas nas passagens terapêutica e tardia das CTM e CPR. As CTM de  
335 passagem precoce são mais resistentes à irradiação ou a danos no DNA induzidos por agentes  
336 genotóxicos e possuem atividade de respostas de danos ao DNA mais eficientes envolvendo  
337 enzima poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) e gene-ATM [35]. Para Fuchs et al. [36] o  
338 aumento do dano ao DNA é forte e significativamente correlacionado com a duração da cultura,  
339 observando entre a P4 e P6 o aumento de 4 vezes mais o índice do dano. Segundo Witte et al.  
340 [37], dependendo da aplicação terapêutica o uso de CTM de passagem baixa pode ainda ser  
341 preferível às CTM de passagem mais alta que na aplicação clínica leva a um maior rendimento,  
342 no entanto, isso pode interferir na eficácia da terapia com celular. Diante disso, como  
343 demonstrado nesse estudo sugere maior atenção na utilização usual na passagem terapêutica de  
344 CTM, bem como nas passagens tardias, para as linhagens desse estudo.

345 As passagens de CPR apresentaram melhores resultados na análise de peroxidação lipídica  
346 e produção de nitrito quando comparada a CTM com atividade de enzimas antioxidantes  
347 preservadas durante o cultivo para as duas linhagens. No estudo de Sprada et al. [38], foram  
348 observados maiores níveis de estresse oxidativo nas primeiras e últimas passagens de CTM

349 sendo mencionado que diferentes métodos de cultivo e origem dos tecidos interferem na  
350 qualidade de células cultivadas. Os resultados desta pesquisa correspondem ao preceito de que  
351 a cultura *in vitro* em longo prazo apresenta menor regulação do estresse oxidativo que ocasiona o  
352 envelhecimento das células-tronco [5].

353 Segundo Valle-Prieto; Conge [39], as CTM em baixas passagens têm uma alta resistência à  
354 morte induzida por estresse oxidativo, que se correlaciona com baixos níveis de espécies reativas  
355 intracelulares, expressão constitutiva de enzimas como SOD, catalase e glutathione reduzida e que  
356 quando esgotados, perdem sua capacidade de “balancear” o estresse oxidativo.

357 A CTM em um estado estacionário baseia-se na glicólise, têm um baixo conteúdo de ROS  
358 e um mecanismo antioxidante ativo, no entanto, à medida que se replicam, estímulos  
359 intracelulares e extracelulares desencadeadores do envelhecimento celular induzem uma  
360 produção acentuada de EROS danificando proteínas e DNA, induzindo a chamada senescência  
361 replicativa, conhecida como senescência prematura induzida por estresse [40]. Nesse estudo  
362 pôde-se associar que o aumento das passagens de CTM promoveu o aumento de peroxidação  
363 lipídica, e mesmo com ação de substâncias antioxidantes mantidas, procedeu-se o surgimento de  
364 danos ao DNA havendo instabilidade genômica seguido de mortalidade celular, enquanto a CPR  
365 obteve controle na produção de TBARS e nitrito, e redução de GSH com melhores resultados  
366 com a manutenção da integridade genética.

367

## 368 5. CONCLUSÃO

369

370 As células-tronco mesequimais e progenitoras renais demonstraram durante o cultivo *in*  
371 *vitro* viabilidade adequada, controle antioxidante e estabilidade genética na passagem precoce,  
372 com melhores resultados para células progenitoras renais durante toda a expansão celular.

373

374

375

376

377

378

379



## 6. REFERÊNCIAS

- 380  
381
- 382 [1] RAVI, MADDALY et al. 3D cell culture systems: advantages and applications. **Journal**  
383 **of Cellular Physiology**, v. 230, n. 1, p. 16-26, 2015.
- 384 [2] CASTRO-MANRREZA, M. E.; MONTESINOS, J. J. Immunoregulation by  
385 mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. **Journal of**  
386 **Immunology Research**, 394917, 2015.
- 387 [3] SAREEN, N. et al. Early passaging of mesenchymal stem cells does not instigate  
388 significant modifications in their immunological behavior. **Stem Cell Research &**  
389 **Therapy**, v. 9, n. 1, p. 121, 2018.
- 390 [4] DRELA, K. et al. Experimental Strategies of Mesenchymal Stem Cell Propagation:  
391 Adverse Events and Potential Risk of Functional Changes. **Stem Cells International**,  
392 7012692, 2019.
- 393 [5] GU, Y. et al. Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in  
394 vitro. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 6, p. 5207-5215, 2016.
- 395 [6] CIEŚLAR-POBUDA, A. et al. ROS and oxidative stress in stem cells. **Oxidative**  
396 **Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- 397 [7] ARAMBURÚ JUNIOR, J. S. et al. DNA damage in dental pulp mesenchymal stem cells:  
398 An *in vitro* study. **Veterinary Research Forum**. v.9, n.4, p. 293–299, 2018.
- 399 [8] HUCH, M. et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult  
400 human liver. **Cell**, v. 160, n. 1-2, p. 299-312, 2015.
- 401 [9] VITALE, I. et al. DNA damage in stem cells. **Molecular Cell**, v. 66, n. 3, p. 306-319,  
402 2017.
- 403 [10] HULING, J.; YOO, J. J. Comparing adult renal stem cell identification, characterization  
404 and applications. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 1, p. 32, 2017.
- 405 [11] BEZERRA, D. O. **Uso terapêutico de células-tronco mesenquimais e células**  
406 **progenitoras renais na síndrome de isquemia/reperfusão renal em suínos**. 2018. 58f.  
407 Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.
- 408 [12] RYU, J.; PRATHER, R. S.; LEE, K. Use of gene-editing technology to introduce targeted  
409 modifications in pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 5,  
410 2018.
- 411 [13] PLENICEANU, O. et al. Renal lineage cells as a source for renal regeneration. **Pediatric**  
412 **Research**, v. 83, n. 1-2, p. 267, 2018.
- 413 [14] DA SILVA, J., FREITAS, T. R. O., MARINHO, J. R., SPEIT, G., AND ERDTMANN,  
414 B. An alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental  
415 biomonitoring with native rodents. **Genetics Molecular Biology**. v.23, n.1, p.241–245,  
416 2000.
- 417 [15] CARVALHO, I.M.C.M.M. et al. Genotoxicity of sodium metabisulfite in mouse tissues  
418 evaluated by the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research/Genetic**

- 419           **Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 720, n. 1, p. 58-61, 2011.
- 420 [16] DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid  
421 peroxidation. **Methods Enzymol**, 186, 421-431, 1990.
- 422 [17] LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of**  
423 **Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- 424 [18] GREEN, LC; TANNENBAUM, SR; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree  
425 and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56-58, 1981.
- 426 [19] SEDLAK, J; LINDSAY, RH. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl  
427 groups in tissues with Ellman`s reagent. **Analytical Biochemistry**, 25, 192-205, 1988.
- 428 [20] CHANCE, B.; MAEHLY, A. C. [136] Assay of catalases and peroxidases. **Methods in**  
429 **Enzymology**, v. 2, p. 764-775, 1955.
- 430 [21] KOBOLAK, J. et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization,  
431 biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-  
432 engineering of their niche. **Methods**, v. 99, p. 62-68, 2016.
- 433 [22] ROJEWSKI, M. T.; WEBER, B. M.; SCHREZENMEIER, H. Phenotypic  
434 characterization of mesenchymal stem cells from various tissues. **Transfusion Medicine**  
435 **and Hemotherapy**, v. 35, n. 3, p. 168-184, 2008.
- 436 [23] BURMEISTER, D. M. et al. Isolation and Characterization of Multipotent CD24+ Cells  
437 From the Renal Papilla of Swine. **Frontiers in Medicine**, v. 5, 2018.
- 438 [24] ANGELOTTI, M. L. et al. Characterization of renal progenitors committed toward  
439 tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. **Stem Cells**, v. 30,  
440 n. 8, p. 1714-1725, 2012.
- 441 [25] SAGRINATI, C. et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from  
442 the Bowman`s capsule of adult human kidneys. **Journal of the American Society of**  
443 **Nephrology**, v. 17, n. 9, p. 2443-2456, 2006.
- 444 [26] GUPTA, S. et al. Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. **Journal of**  
445 **the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 11, p. 3028-3040, 2006.
- 446 [27] SHRESTHA, S. et al. Characterization and determination of cadmium resistance of  
447 CD133+/CD24+ and CD133-/CD24+ cells isolated from the immortalized human  
448 proximal tubule cell line, RPTEC/TERT1. **Toxicology and Applied Pharmacology**,  
449 2019.
- 450 [28] WIATER, J. et al. Identification of perivascular and stromal mesenchymal  
451 stem/progenitor cells in porcine endometrium. **Reproduction in Domestic Animals**, v.  
452 53, n. 2, p. 333-343, 2018.
- 453 [29] BRUNO, S.; CHIABOTTO, G.; CAMUSSI, G. Concise review: different mesenchymal  
454 stromal/stem cell populations reside in the adult kidney. **Stem Cells Translational**  
455 **Medicine**, v. 3, n. 12, p. 1451-1455, 2014.

- 456 [30]MOLL, G. et al. Cryopreserved or fresh mesenchymal stromal cells: only a matter of taste  
457 or key to unleash the full clinical potential of MSC therapy?. In: **Biobanking and**  
458 **Cryopreservation of Stem Cells**. Springer, Cham, 2016. p. 77-98.
- 459 [31]CUMMINGS, B. S.; LASKER, J. M.; LASH, L. H. Expression of glutathione-dependent  
460 enzymes and cytochrome P450s in freshly isolated and primary cultures of proximal  
461 tubular cells from human kidney. **Journal of Pharmacology and Experimental**  
462 **Therapeutics**, v. 293, n. 2, p. 677-685, 2000.
- 463 [32]YAMAMOTO, Y.; OCHIYA, T. Epithelial stem cell culture: modeling human disease  
464 and applications for regenerative medicine. **Inflammation and Regeneration**, v. 37, n. 1,  
465 p. 3, 2017.
- 466 [33]LIU, D. al. Circulating apoptotic bodies maintain mesenchymal stem cell homeostasis  
467 and ameliorate osteopenia via transferring multiple cellular factors. **Cell Research**, v. 28,  
468 n. 9, p. 918, 2018.
- 469 [34]PRIETO, P. et al. Cell expansion-dependent inflammatory and metabolic profile of  
470 human bone marrow mesenchymal stem cells. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 548,  
471 2016.
- 472 [35]WU, Po-Kuei et al. Early passage mesenchymal stem cells display decreased  
473 radiosensitivity and increased DNA repair activity. **Stem Cells Translational Medicine**,  
474 v. 6, n. 6, p. 1504-1514, 2017.
- 475 [36]FUCHS, R. et al. Modification of the alkaline comet assay with human mesenchymal  
476 stem cells. **Cell Biology International**, v. 36, n. 1, p. 113-117, 2012.
- 477 [37]WITTE, S.F.H. et al. Aging of bone marrow–and umbilical cord–derived mesenchymal  
478 stromal cells during expansion. **Cytotherapy**, v. 19, n. 7, p. 798-807, 2017.
- 479 [38]SPRADA, A. G. et al. Toxicity and oxidative stress of canine mesenchymal stromal cells  
480 from adipose tissue in different culture passages. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35,  
481 p. 15-20, 2015.
- 482 [39]VALLE-PRIETO, A.; CONGET, P. A. Human mesenchymal stem cells efficiently  
483 manage oxidative stress. **Stem cells and Development**, v. 19, n. 12, p. 1885-1893, 2010.
- 484 [40]VONO, R. et al. Oxidative stress in mesenchymal stem cell senescence: regulation by  
485 coding and noncoding RNAs. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 9, p. 864-879,  
486 2018.

## **CAPÍTULO II\***

\*Apresentado segundo normas do periódico Renal Failure

## Potencial regenerativo, antioxidante e genoprotetor das células progenitoras renais e de células-tronco mesenquimais em lesão do rim de suínos

Elís Rosélia Dutra de Freitas Siqueira Silva<sup>a</sup> Maria Acelina Martins de Carvalho<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Brasil

<sup>b</sup> Professora Titular, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Brasil

### RESUMO

A lesão de isquemia/reperfusão renal (IRR) possui um mecanismo complexo que envolve a produção de radicais livres, inflamação, apoptose e necrose. Terapias alternativas como o uso de células-tronco tem recebido atenção devido ao seu efeito renoprotetor. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante e genoprotetor, a proliferação e apoptose celular, e a angiogênese, no tratamento da lesão renal em suínos, utilizando células progenitoras renais (CPR) e células-tronco mesenquimais (CTM). Foram utilizados 15 suínos divididos em três grupos (GC – Controle, GE1- tratamento com CTM e GE2 - tratamento com CPR). Foram coletados fragmentos de tecido renal mediante biopsias seriadas nos dias 4 e 8 após a indução de IRR para análise da proliferação celular (ki-67), apoptose (caspase-3-clivada) e a angiogênese (VEGF) por imunistoquímica. Para avaliação do dano ao DNA foi realizado o ensaio de cometa, e o estresse oxidativo, pela mensuração dos níveis de peroxidação lipídica, nitrito e atividade de enzimas antioxidantes. Foi verificado que animais do GC, GE1 e GE2 apresentaram marcação semelhante para proliferação celular nos túbulos renais, diferindo, apenas em relação às células glomerulares no dia 4 e intersticiais ( $p < 0,05$ ) no GE1. Já, quanto à mensuração de células apoptóticas o GC obteve maiores níveis que o GE1 e o GE2, exceto no dia 8 do GE1. A expressão da angiogênese não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos, no entanto, nos glomérulos e nos vasos peritubulares, a expressão do marcador, prevaleceu no GE2. Na análise do estresse oxidativo, o G1 se destacou, com altos níveis de ácido tiobarbitúrico (TBARS) e nitrito, e baixa glutatona reduzida e catalase ( $p < 0,05$ ). Quanto aos danos ao DNA, nos animais do GE1 apresentaram maior frequência e índice comparados aos do GC negativo e GE2, com uma redução durante os dias no GE2. Com base nos achados *in situ* do rim quanto à angiogênese e apoptose celular, os animais tratados com células-tronco mesenquimais e células progenitoras renais apresentaram melhores resultados comparados aos suínos não tratados. Ademais, referentemente, ao estresse oxidativo e a genoproteção, o tratamento com células progenitoras renais, demonstrou maior eficácia.

**Palavras-chave:** nefropatia, terapia celular, estresse oxidativo, danos ao DNA, regeneração

## 1. INTRODUÇÃO

A lesão de isquemia-reperfusão é causada por um comprometimento súbito e temporário do fluxo sanguíneo para o órgão em particular. No rim, a isquemia-reperfusão (IRR) é uma consequência relevante e inevitável após o transplante renal que influencia no resultado do enxerto e contribui no desenvolvimento da lesão renal aguda (LRA) com disfunção renal rápida e altas taxas de mortalidade (KELLUM; UNRUH; MURUGAN, 2011; MALEK; NEMATBAKSH, 2015; SALVADORI; ROSSO; BERTONI; 2015).

No rim isquêmico e subsequente à reoxigenação, a geração de radicais livres na fase de reperfusão inicia uma cascata de respostas celulares deletérias que levam à inflamação, morte celular e insuficiência renal aguda (MALEK; NEMATBAKSH, 2015). Vries et al. (2013) relatam que embora os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à IRR não sejam claros, o dano oxidativo é considerado um fator-chave no início IRR, e que extinguir as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERN), limita o dano oxidativo e procede a redução da IRR.

Terapias alternativas, como a aplicação de Células-Tronco Mesenquimais (CTM), tem recebido ênfase devido ao seu efeito renoprotetor, incluindo os estudos voltados para a reparação da IRR com estímulo da proliferação celular tubular, mecanismos de angiogênese e remodelação vascular, redução de apoptose e necrose tubular aguda, diminuição do estresse oxidativo e respostas pró-inflamatórias (FURUICHI et al., 2012; LIU et al., 2012; CHEN et al., 2011). Contudo, a aplicação clínica de CTM gera riscos devido aos potenciais de diferenciação, às propriedades imunossupressoras e a alguma possível imortalização/transformação durante a cultura de longo prazo das CTM (SENSEBE et al., 2010).

As atividades reduzidas de enzimas antioxidantes podem induzir CTM à senescência celular em resposta ao estresse oxidativo (KO; LEE; HWANG, 2011). Em rins submetidos à IRR a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pode formar metabólitos citotóxicos capazes de causar peroxidação lipídica e danos no DNA (NOIRI et al., 2018). Sendo assim, é necessário avaliar com maior segurança o emprego com células-tronco em um órgão submetido à isquemia-reperfusão, pois ocasiona possíveis riscos no tratamento ao expor as células ao ambiente em desequilíbrio na produção de radicais livres e comprometer sua integridade genômica promovendo alterações na proliferação e senescência celular.

O papel da CTM na diferenciação e substituição celular direta também tem sido contestado no tratamento de lesões renais. LIU et al. (2012) relatam a que este fato não ocorre ou aparece com pouca frequência. Nesse caso, outra estratégia na terapia celular é o uso de células obtidas do rim, como as células progenitoras renais (CPR) que possuem alto potencial clonogênico, capacidade de auto-renovação, e de se diferenciar em linhagens de células renais específicas, o que sugere uma fonte potencial terapêutica para a regeneração renal (BECHERUCCI et al., 2018; CHUNG et al., 2015). Entretanto, a avaliação da sua possível genoproteção e efeito antioxidante em rins submetidos à IRR são escassos e requerem maiores investigações.

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante, genoprotetor, além da proliferação e apoptose celular e angiogênese, no tratamento da isquemia-reperfusão em suínos, utilizando as células-tronco mesenquimais (CTM) e células progenitoras renais (CPR).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Delineamento experimental**

Utilizou-se um delineamento em três grupos inteiramente casualizados, com três repetições cada e espaço amostral composto por 15 suínos induzidos por IRR. Os grupos experimentais foram submetidos ao tratamento com CTM e CPR e o grupo controle com NaCl 0,9% sendo avaliados em dois momentos após a indução da IRR, no dia 4 e 8, por meio de análise imunohistoquímica, testes de mensuração do estresse oxidativo e ensaio de cometa.

### **2.2 Animais**

Os protocolos utilizados foram aprovados junto a Comissão de Ética no Uso Animal CEUA/UFPI sob nº 269/16. Foram utilizados 15 suínos machos saudáveis submetidos à indução da nefropatia por modelo de isquemia total bilateral durante 01 hora, seguido de reperfusão sanguínea. Após esse procedimento, foi aplicado via intraparenquimatosa renal 1 mL de NaCl 0,9% no grupo controle, e nos grupos experimentais, a dose de  $1 \times 10^6$  célula/animal. Foram utilizadas células isoladas armazenadas no banco de células do Laboratório de Cultivo Celular (LABCelt) do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt/UFPI), previamente analisadas após o descongelamento quanto à viabilidade e a caracterização para

CTM com marcação CD14-, CD24-, CD133-, CD105+, CD90+, CD106+, CD140b+ (passagem 05) e CPR com CD14-, CD105-, CD140b-, CD90+, CD133+ (passagem 02).

A coleta do córtex renal foi realizada de forma seriada por meio de biópsia percutânea com o uso de agulha ajustável de biópsia (Super-Core™ II, 16ga x 15cm) guiada por aparelho de ultrassom com posterior avaliação histopatológica e rastreamento dos nanocristais fluorescentes (Q-tracker®) conforme protocolo de Costa et al. (2017). Os fragmentos ao dia 4 e 8 após a cirurgia de indução de isquemia-reperfusão foram submetidos à análise por ensaio de cometa e imunistoquímica e no dia 8 a mensuração dos níveis de enzimas antioxidantes, nitrito e dos produtos da peroxidação lipídica.

### **2.3 Análise de imunistoquímica**

Os fragmentos do tecido renal foram fixados em formol tamponado com fosfato 0,01M pH 7,4, processados e embebidos em parafina segundo técnicas adotadas no Laboratório de Morfologia (LABMorf) do NUPCelt/UFPI. Os cortes de 5µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas a 4% em acetona (organosilano, 3-Trethoxysilyllpropylamine, A3449, Sigma). Foram desparafinados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato 0,1M, pH 6,0 em banho-maria a 96° por 20 minutos e esfriamento por 20 minutos em temperatura ambiente, foram submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% em metanol por 30 minutos no escuro e lavados com PBS. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com soro fetal bovino 1,5% em PBS. Posteriormente os tecidos foram incubados overnight a 4°C em atmosfera úmida com os diferentes anticorpos monoclonais primários: Ki-67 (SP6) (cat. MA5-14520, Termo Fisher Scientific) na diluição de 1:50; Cleaved Caspase-3 (Asp175) (D3E9) (cat 9579S, Cell Signaling Technology) e VEGF (JH121) (cat. MA5-13182, Termo Fisher Scientific) com diluição de 1:100. A amplificação da reação foi realizada utilizando-se o sistema Envision+Sistem-HRP Labelled polymer, anti-mouse (DAKO). Todas as etapas foram intercaladas por lavagens em PBS. Para a revelação foi utilizado 0,3 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical, USA) em PBS com 0,06% de peróxido de hidrogênio. Seguiu-se a contracoloração com hematoxilina de Harrys e montagens das lâminas para análise.

As imagens foram capturadas por meio do analisador de imagem computadorizada Leica Qwin D-1000, versão 4.1 (versão 4.1: Cambridge, UK). Foram capturados 20 campos



aleatoriamente por corte de tecido renal de cada animal, incluindo as regiões cortical, córtico-medular e medular, e realizadas a contagem de células em apoptose e proliferação. Devido à marcação intracitoplasmática do anticorpo anti-VEGF em túbulos degenerados atribuiu-se escores para avaliar a angiogênese realizada por observação às cegas e mensuradas pela intensidade da coloração e área corada positivamente em cada compartimento diferente (glomérulos, túbulos, interstício e vasos peritubulares). Para efeito da análise, convencionou-se definir para cada valor da escala de 0 a 4+ os seguintes escores: 0 para 0; 0,5 para 1; 1,0 para 1+; 2,0 para 2+; 3,0 para 3+, e 4,0 para 4+ (TAAL et al., 2012).

## **2.4 Avaliação do Estresse Oxidativo**

O tecido renal, após a biópsia no dia 8 foi macerado e homogeneizado a 10% (tampão fosfato de sódio, pH 7,4) para a determinação da peroxidação lipídica por mensuração dos níveis de TBARS, teores de nitrito e dos sistemas antioxidantes com verificação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) e da Catalase (CAT) realizadas no Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF/UFPI) .

### **2.4.1 Determinação de peroxidação lipídica**

O grau de lipoperoxidação foi medido por meio da determinação dos níveis de TBARS, conforme método de Draper; Hadley (1990). O homogenato (250 µL), previamente preparado, foi adicionado em um tubo e agitado juntamente com o ácido tricloroacético 10% (1 mL) e solução de ácido tiobarbitúrico 0,67% (1 mL). Posteriormente, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente por 15 minutos, e, em seguida, resfriada em água corrente. Após o resfriamento, a mistura foi centrifugada com n-butanol (2 mL) a 1200rpm por 5 minutos. A fase butanólica de coloração rosa foi medida pela leitura em espectrofotômetro a 535 nm. A concentração de proteína foi determinada de acordo com o trabalho de Lowry et al. (1951). Os resultados foram expressos em nM/g de tecido.

### **2.4.2 Teor de Nitrito**

Para a verificação da concentração de nitrito foi usado o método descrito por Green; Tannenbaum; Goldman (1981). Foi adicionado em um tubo 500 µL do reagente de Gries e 500 µL do homogenato, com a leitura realizada em espectrofotômetro a 560 nm.

### **2.4.3 Determinação do nível de glutathiona reduzida**

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi baseada na reação de Ellman [5,50-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)] de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1988) com algumas modificações. Foram adicionados 400 µL do homogenato renal, 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloroacético a 50% num tubo de ensaio. O material foi agitado e centrifugado a 3.000 rpm por 15 min. Em seguida, 800 µl de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e 20 µl de DTNB 0,01 M (ácido 5,5'-ditio-bis- [ácido 2-nitrobenzóico]) foram adicionados a 400 µl do sobrenadante e após 1 minutos da reação, a absorbância foi registrada em 412 nm. Os resultados foram expressos em tecido U/g.

### **2.4.4 Determinação da atividade da catalase**

Para a determinação da atividade enzimática da catalase foi usado método descrito por Chance; Maehly (1955). O meio reacional foi preparado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (18 mL), tampão Tris HCl 1 M, EDTA 5 nM pH 8,0 (1,0 mL) e H<sub>2</sub>O (0,8 mL). Uma alíquota (980 ml) do meio reacional foi misturada com 20 ul do homogenato renal e foram incubadas a 37 ° C, em seguida os níveis de absorvância foram lidos a cada 1 minuto até 6 minutos a 230 nm. A absorbância do meio reacional, mas sem o homogenato em 230 nm, foi considerada como o branco. A concentração de proteína foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951). Os resultados foram expressos em mM/min/mg de proteína.

### **2.5 Teste do Cometa**

O ensaio foi realizado em condições alcalinas (pH > 13), segundo Da Silva et al. (2000). Uma alíquota (10 ul) do homogenato renal a 10% em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) foi misturada com 95 ul de agarose com baixo ponto de fusão a 0,75%. Esta mistura foi então homogeneizada e transferida para lâminas pré-revestidas com 5% de agarose. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas permitindo solidificar a 30 °C durante 20 minutos, mantendo-as na horizontal. As lamínulas foram removidas e as lâminas imersas em solução de lise (2,5 M/L NaCl, 100 mM/L EDTA, 10 mM/L Tris-HCl, pH 10-12, 1% Triton X-100, e 10% DMSO), resfriadas e protegidas da luz por 72 horas sob condição refrigerada (4 °C).

Para a desnaturação do DNA, as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese, com solução tampão (30 mM/L NaOH e 1 mM/L de EDTA, pH 13) a 30 °C durante 20 minutos no escuro, realizada a 25V e 300 mA. As lâminas foram então neutralizadas (400 mM Tris, pH 7.5), durante 3 ciclos de 5 minutos cada, lavadas com água destilada e submetidas secagem em temperatura ambiente, seguindo-se o tratamento com solução de fixação contendo 15% (p/v) de ácido tricloroacético, 5% (p/v) de sulfato de zinco e 5% (p/v) glicerol, durante 10 minutos. Após repetição da lavagem e secagem, as lâminas foram hidratadas durante 5 minutos com água destilada para coloração com: 34 mL de solução B contendo 0,2% (p/v) de nitrato de amônio, 0,2% (p/v) de nitrato de prata, 5% (p/v) de ácido tungstosilícico, 0,15% (p/v) formaldeído e 5% (p/v) de carbonato de sódio e 66 mL de solução A com 5% (p/v) de carbonato de sódio por 30 minutos a 37 °C com proteção da luz. Após o processo de coloração, a lavagem final foi feita com água destilada.

A leitura das lâminas foi realizada em ensaio às cegas no microscópio óptico em aumento de 400x, contabilizando 100 células por animal. A avaliação seguiu os métodos de Carvalho et al. (2011) para calcular a frequência de dano (FD) com base no número de células com ou sem cauda e o índice de dano (ID) em que as células foram visualmente alocadas em cinco classes de acordo com o tamanho da cauda (0 = sem caudas e 4 = caudas de comprimento máximo) em um único escore de dano ao DNA para cada amostra e conseqüentemente para cada grupo estudado, podendo variar de 0 (completamente sem danos = 100 células × 0) a 400 (dano máximo = 100 células × 4).

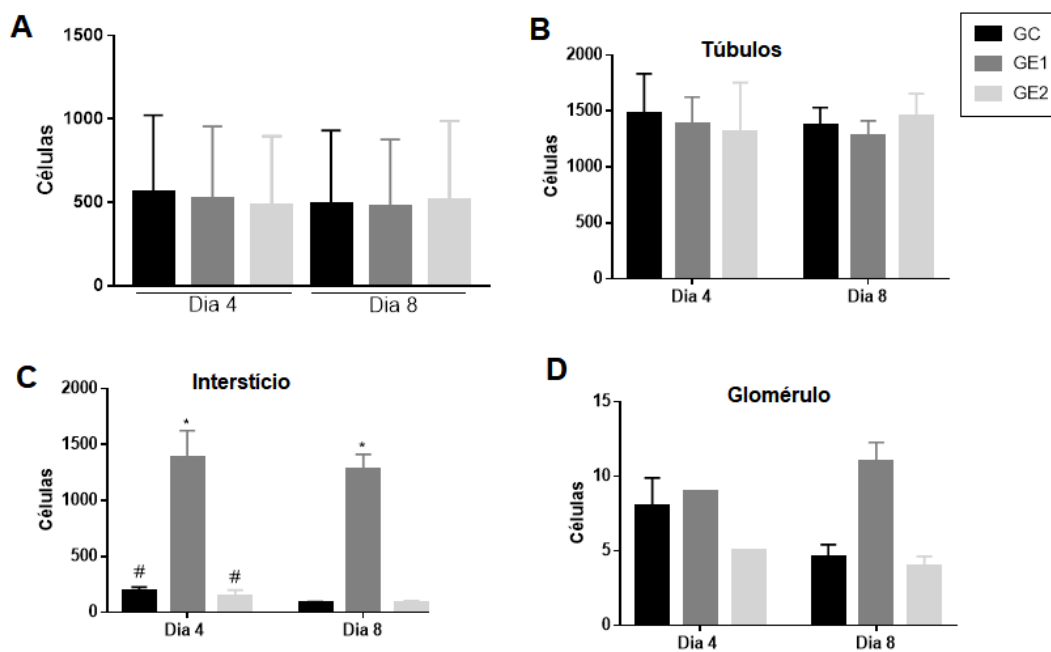
## 2.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tuckey e *Neuman-Keuls* como *post hoc test*. Os dados foram analisados utilizando o *software GraphPad Prism 7.0* (San Diego, CA, EUA), os grupos experimentais foram comparados com o grupo controle e entre si. As diferenças foram consideradas, estatisticamente, significativas até  $p < 0,05$ . Todos os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.).

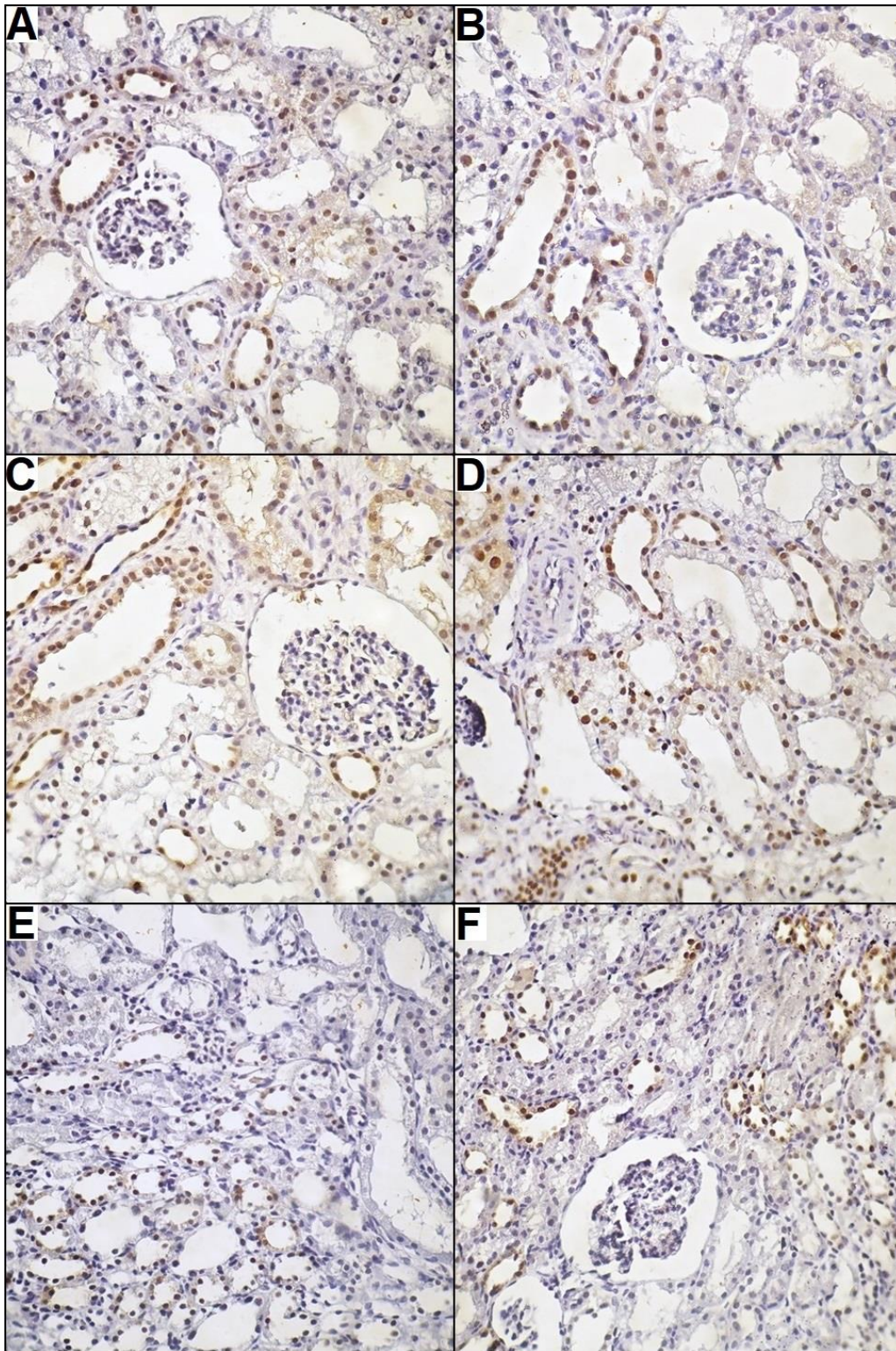
### 3. RESULTADOS

A distribuição das marcações no tecido renal, por técnica de imunistoquímica e as principais lesões histológicas, degeneração tubular vacuolar, nefrose, ectasia e nefrite, foram observadas principalmente nos túbulos renais em todos os grupos analisados. Ademais, por rastreamento celular no tecido renal, foi verificado que as células situavam-se no interstício renal nos animais do grupo GE1 e nos túbulos, glomérulos e interstício renais no GE2.

A análise de imunistoquímica para proliferação celular (ki-67) apresentou marcação nuclear e em alguns casos citoplasmática, com predomínio nos túbulos renais. (Figura1). Na contagem geral de células marcadas com ki-67 não se identificou diferença entre os grupos e nem entre os dias ( $p>0,05$ ). Foi demonstrada diferença estatística significativa nas células intersticiais dos animais do GE1 ( $p<0,05$ ), no 4 e 8 dia comparadas aos demais grupos do mesmo dia de tratamento e no dia 8 comparado ao GC e GE2 do dia 4 ( $p<0,05$ ). Verificou-se que houve um decréscimo do marcador durante os dias em células glomerulares, tubulares e intersticiais de todos os grupos, exceto o aumento observado entre o dia 4 e 8 das células tubulares do GE2 e das células glomerulares do GE1 (Gráfico 1).



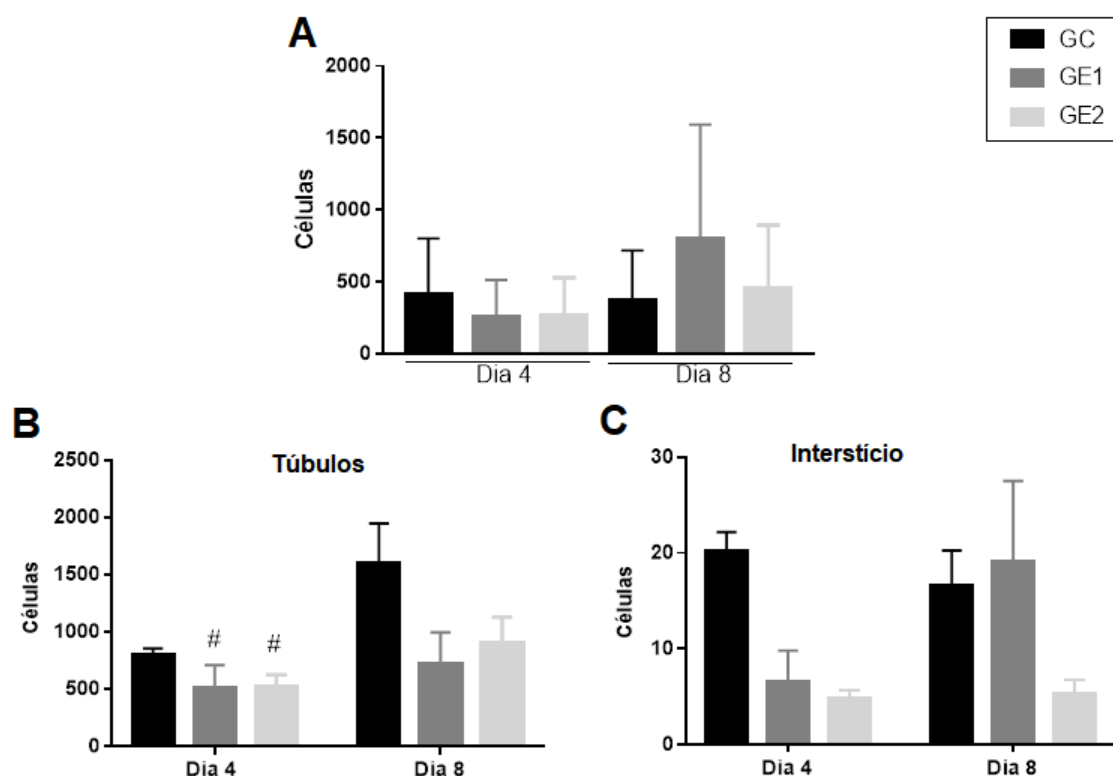
**Gráfico 1.** Análise quantitativa da proliferação celular (ki-67: marcador nuclear) em rim de suínos por grupos de tratamento (GC: controle, GE1: CTM e GE2: CPR) após 4 e 8 dias da indução da lesão de isquemia-reperfusão. **A.** Marcação total de células; **B.** Marcação de células tubulares; **C.** Marcação de células intersticiais; **D.** Marcação de células glomerulares. \* diferença significativa entre GE1 com GC e GE2 no mesmo dia de tratamento; # diferença significativa do GC e GE2 do dia 4 com GE1 do dia 8. ANOVA *two way-Tukey*.  $p<0,05$



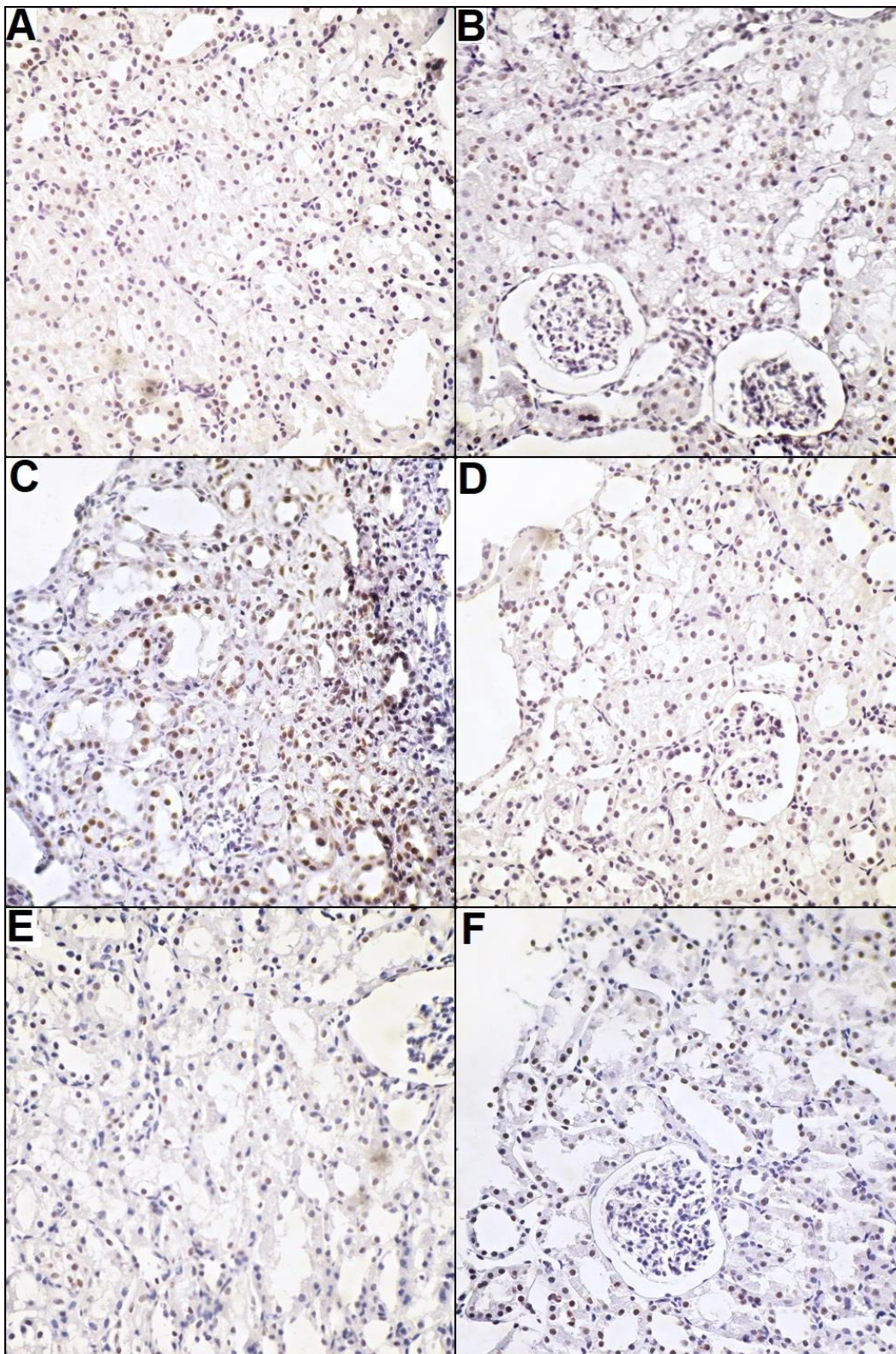
**Figura 1.** Marcação por imunistoquímica de Ki67 (marcador nuclear de proliferação celular) em rim suíno. **A.** Grupo Controle no dia 4; **B.** Grupo Controle no dia 8; **C.** Grupo Experimental tratado com CTM no dia 4; **D.** Grupo Experimental tratado com CTM no dia 8; **E.** Grupo Experimental tratado com CPR no dia 4; **F.** Grupo Experimental tratado com CPR no dia 8.



As células apoptóticas foram visualizadas com marcação nas células tubulares e intersticiais, predominando nas primeiras e não identificadas nas células glomerulares (Figura 2). Houve diferença estatística na contagem das células tubulares com menores níveis de apoptose dos animais tratados no dia 4 comparado ao GC no dia 8 ( $p < 0,05$ ). Ainda, pode-se observar que o GC teve maiores e os grupos tratados menores níveis de apoptose ao decorrer dos dias, exceto o GE1 em que se observou um aumento de apoptose de células totais e intersticial no dia 8 (Gráfico 2).

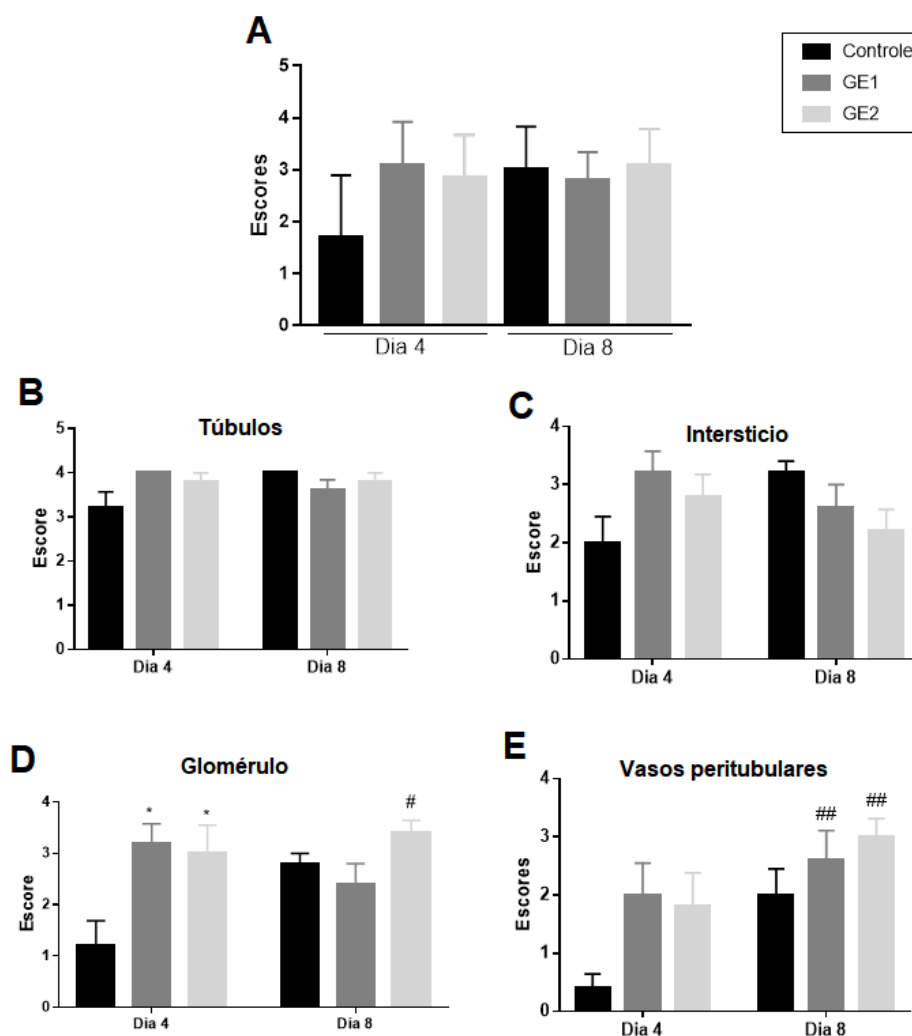


**Gráfico 2.** Análise quantitativa de apoptose celular (Caspase-3-clivada: marcador nuclear) em rim de suínos por grupos de tratamento (GC: controle, GE1: CTM e GE2; CPR) após 4 e 8 dias da indução da lesão de isquemia-reperfusão. **A.** Marcação total de células; **B.** Marcação de células tubulares; **C.** Marcação de células intersticiais # diferença significativa entre GE1 e GE2 do dia 4 com o GC do dia 8. ANOVA *two way-Tukey*.  $p < 0,05$ .



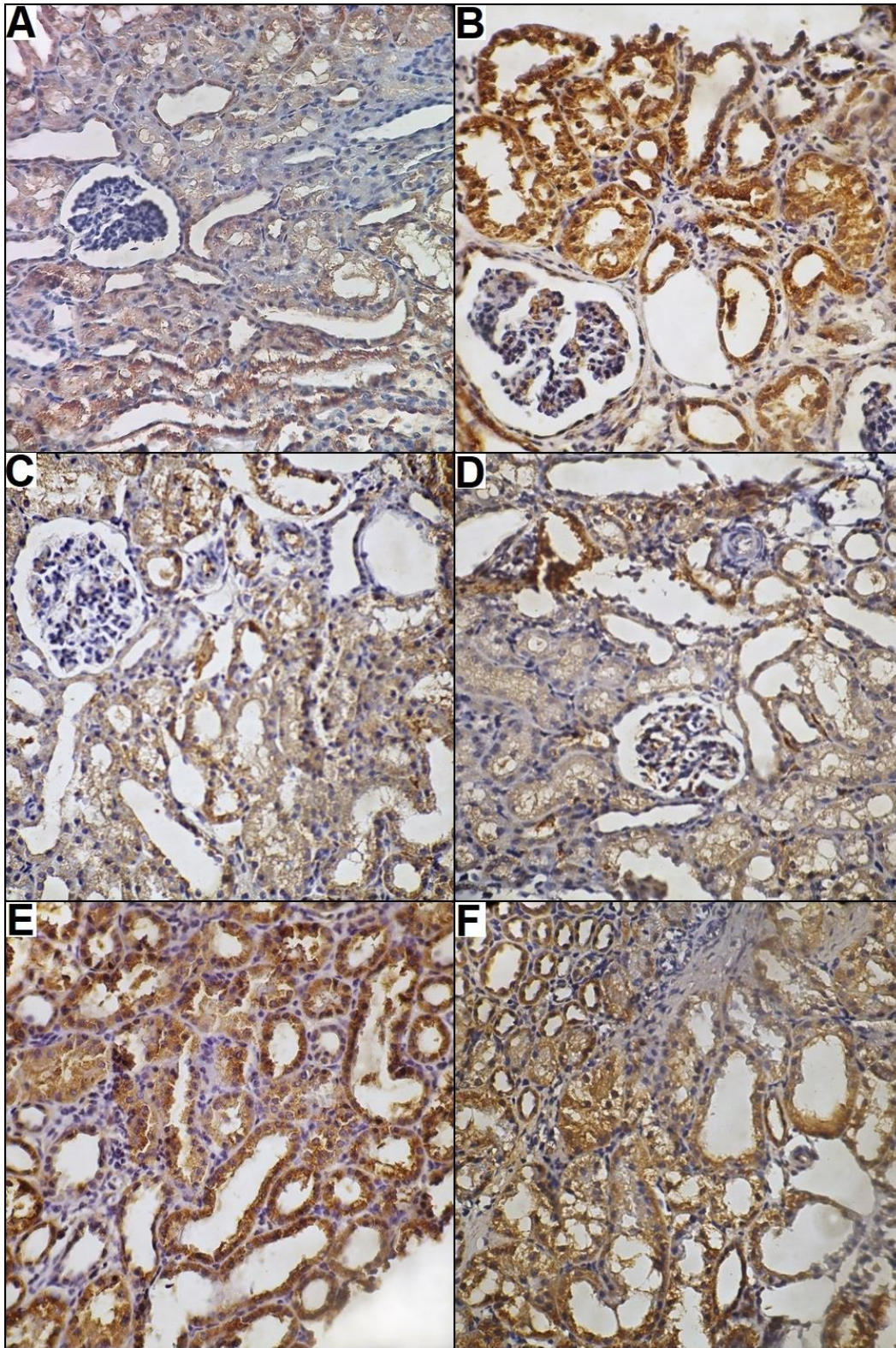
**Figura 2.** Marcação por imunistoquímica de caspase-3-clivada (marcador nuclear de apoptose) em rim suíno. **A.** Grupo Controle no dia 4; **B.** Grupo Controle no dia 8; **C.** Grupo Experimental tratado com CTM no dia 4; **D.** Grupo Experimental tratado com CTM dia 8; **E.** Grupo Experimental tratado com CPR no dia 4; **F.** Grupo Experimental tratado com CPR no dia 8.

Na avaliação da angiogênese verificou-se marcação intracitoplasmática na região dos glomérulos, interstício, vasos peritubulares e predominantemente nos túbulos renais (Figura 3). De forma geral, o GC apresentou baixo nível de angiogênese comparado aos animais tratados no 4 dia, alcançando níveis próximos no 8 dia. No glomérulo os grupos tratados no dia 4 e GE2 no dia 8 apresentaram mais expressão de VEGF do que o GC no dia 4 ( $p < 0,05$ ). Nos vasos peritubulares, os grupos tratados demonstraram mais expressão do que não tratados, com diferença estatística entre o GE1 e GE2 do dia 8 com o GC no dia 4 ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 3).



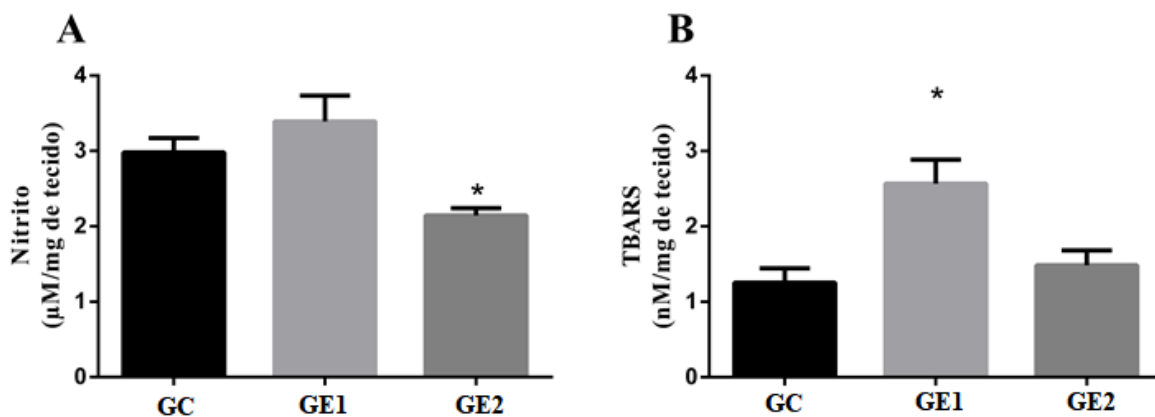
**Gráfico 3.** Análise por escore da angiogênese (VEGF: marcador de intracitoplasmático) em rim de suínos por grupos de tratamento (GC: controle, GE1: CTM e GE2: CPR) após 4 e 8 dia da indução da lesão de isquemia-reperusão. **A.** Marcação total de células; **B.** Marcação de células tubulares; **C.** Marcação de células intersticiais; **D.** Marcação de células glomerulares; **E.** Marcação de vasos peritubulares. \*diferença significativa entre o GE1 e GE2 com o GC no mesmo dia de tratamento; #diferença significativa do GE2 do dia 8 com GC do dia 4; ## diferença significativa entre GE1 e GE2 dia 8 com GC dia 4. ANOVA two way - Tukey.  $p < 0,05$ .





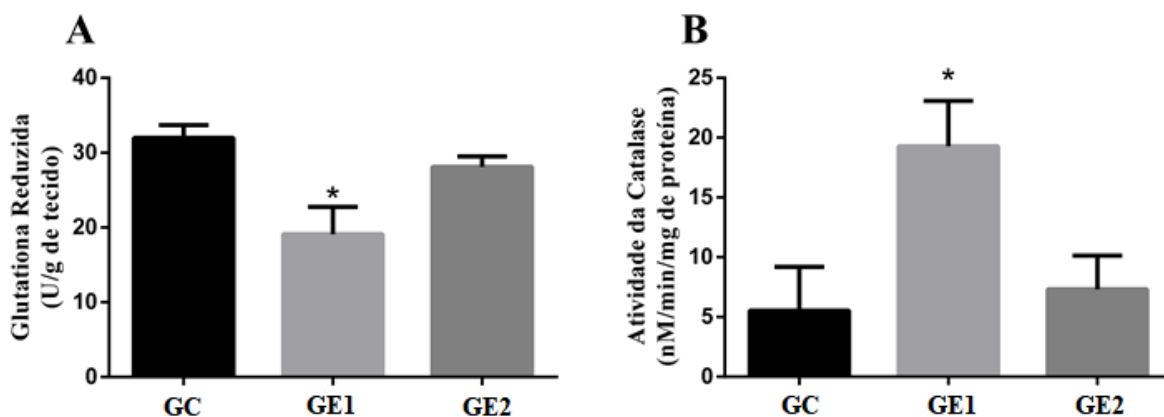
**Figura 3.** Marcação por imunistoquímica de VEGF (marcador intracitoplasmático de angiogênese) em rim suíno. **A.** Grupo Controle no dia 4; **B.** Grupo Controle no dia 8; **C.** Grupo Experimental tratado com CTM no dia 4; **D.** Grupo Experimental tratado com CTM no dia 8; **E.** Grupo Experimental tratado com CPR no dia 4; **F.** Grupo Experimental tratado com CPR no dia 8.

O estresse oxidativo resultante da produção de nitrito e peroxidação lipídica avaliados no dia 8, no grupo GE1 apresentaram aumento nos teores de TBARS ( $p < 0,05$ ) e nitrito, enquanto no GE2 reduziu os teores de TBARS e nitrito ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle (Gráfico 4).



**Gráfico 4.** Mensurações dos níveis de peroxidação lipídica e teor de nitrito no tratamento com CTM (GE1) e CPR (GE2) em rim de suínos submetidos a lesão de isquemia-reperfusão. **A.** Nitrito. **B.** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). \*diferença significativa quando comparado ao grupo controle (GC). ANOVA - *Neuman-Keuls*.  $p < 0,05$ .

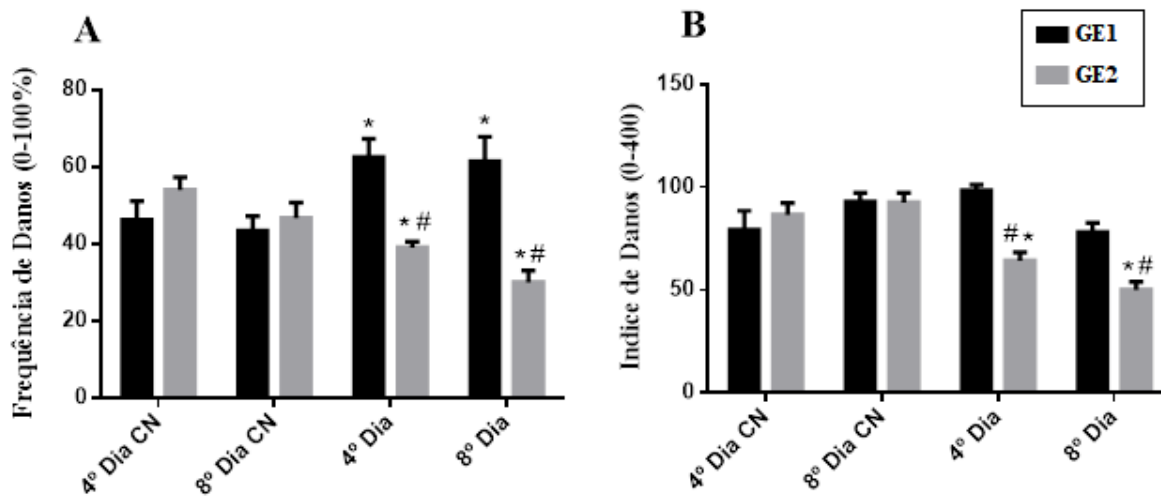
Na mensuração das enzimas antioxidantes, os animais com tratamento demonstraram atividade reduzida da GSH e aumentada da catalase quando comparados ao GC, com diferença estatística no GE1 ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 5).



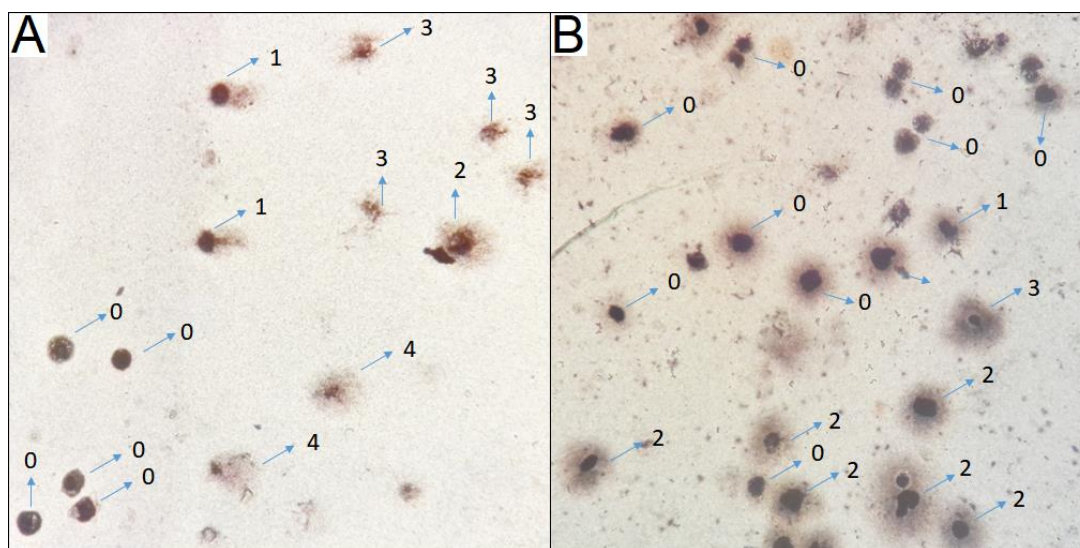
**Gráfico 5.** Atividade de enzimas antioxidantes no tratamento com CTM (GE1) e CPR (GE2) em rim de suínos submetidos a lesão de isquemia-reperfusão. **A.** Glutaciona reduzida (GSH). **B.** Catalase. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). \* diferença significativa quando comparado ao grupo controle (GC). ANOVA - *Neuman-Keuls*.  $p < 0,05$ .



Os achados de genoproteção demonstraram diferentes classes de danos entre os grupos tratados (Figura 4). Observou-se maior frequência de danos no DNA do GE1 e menor no GE2 quando comparado ao controle negativo (CN) ( $p < 0,05$ ). Quanto ao índice de danos ao DNA, o GE1 apresentou aumento do índice no dia 4 ( $p < 0,05$ ) com posterior redução no dia 8, e o GE2 reduzido nos dois momentos. Ademais, observou-se que o GE2 obteve reduzidas frequências e índices de danos durante os dias quando comparados ao GE1 (Gráfico 6).



**Gráfico 6.** Avaliação seriada da genoproteção do tratamento com CTM (GE1) e CPR (GE2) em rim de suínos submetidos a lesão de isquemia-reperfusão. **A.** Frequência de danos; **B.** Índice de danos. \* diferença significativa quando comparado ao grupo controle negativo (CN) do respectivo grupo; # diferença significativa quando comparado ao grupo tratado com GE1 no mesmo dia do tratamento. ANOVA - *Neuman-Keuls*.  $p < 0,05$ .



**Figura 4.** Classificação de danos ao DNA (seta 0, 1, 2, 3 e 4) em tecido renal de suínos analisados pelo Ensaio Cometa. **A.** Grupo com tratamento CTM; **B.** Grupo com tratamento CPR.

#### 4. DISCUSSÃO

As marcações observadas por técnica de imunistoquímica situaram-se predominantemente nos túbulos renais, nos quais, foram visualizadas as lesões histológicas. A ausência de células apoptóticas nos glomérulos confirma o proposto por Kumar; Abbas; Fausto, (2016) em que as lesões de IRR e sua regeneração ocorrem mais nos túbulos renais.

A regeneração tecidual, neste estudo, divergiu em alguns aspectos das investigações envolvendo CTM no tratamento de IRR. Em ratos submetidos à IRR, ocorreu o aumento da proliferação e apoptose celular na resposta ao tratamento com células-tronco (CAO et al., 2010; LIU et al., 2012). Neste trabalho a proliferação celular só ocorreu nas células glomerulares e intersticiais do grupo GE1, enquanto nas células apoptóticas inicialmente promoveu altos níveis nos animais sem tratamento e com a evolução dos dias ocorreu o aumento dos grupos tratados para o GE1, principalmente no interstício ( $p < 0,05$ ). O rastreamento das CTM no interstício evidencia a resposta celular intersticial do GE1 associada possivelmente ao efeito parácrino das CTM, que tem sido proposto como o principal mecanismo que contribui para a reparação tecidual (LIANG et al., 2014).

O aumento da angiogênese foi observado principalmente nos animais tratados nos primeiros 4 dias o que pode auxiliar a resolução com o aumento do aporte sanguíneo imediato e surgindo esse aumento nos não tratados apenas no 8 dia, como ocorre na patogênese de cicatrização normal do órgão com o a expressão de VEGF em uma fase tardia da regeneração (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2016). Notou-se ainda, que os grupos tratados apresentaram mais estímulo de angiogênese em todo o rim, diferentemente dos não tratados, inclusive nos glomérulos e vasos peritubulares que compreendem células endoteliais e podócitos nos glomérulos (TUFRO; VERON, 2012). Resultado semelhante para terapia com CPR foi encontrado por Aggarwal et al., (2016) com aumento da angiogênese em ratos após LRA e Chen et al., (2011) com CTM em ratos submetidos a IRR, sugerindo que a angiogênese ocorreu em áreas intersticiais e peri-tubulares para possível reparo e regeneração tubular após o transplante CTM, dando ênfase a possível ação parácrina de CTM e CPR nesta pesquisa.

Na análise de enzimas antioxidantes, a redução de GSH no GE1 apresenta divergência com outros estudos, nos quais foram obtidos, aumento na GSH ( $p < 0,05$ ) minimizando danos de estresse oxidativo nos rins após a lesão IRR e LRA induzida por cisplatina. (CHEN et al 2011;

ZHOU et al., 2013). Contudo, a atividade da catalase aumentou no GE1 ( $p < 0,05$ ), semelhante a Mias et al., (2009) na terapia em ratos com IRR recebendo CTM tratadas *ex vivo* com melatonina, que promoveu sua atividade antioxidante direta e redução da morte precoce de CTM. Já o aumento TBARS ( $p < 0,05$ ) e nitrito no GE1 convergem com os achados de outros autores (FAHMY et al., 2013; ERPICUM et al., 2017; MASOUD et al., 2012) que reduziram os níveis de MDA (malondialdeído) e iNOS (óxido nítrico sintases) nos tratamento de lesão renal com CTM em roedores.

As CPR demonstraram eficácia em reverter a patogenia da IRR com redução dos produtos da peroxidação lipídica e aumento da atividade das enzimas antioxidantes, enquanto a terapia com CTM não promoveu a depleção do estresse oxidativo no órgão. Este experimento utilizou passagem P5 de CTM, enquanto pesquisas mencionam de forma superficial um curto tempo de cultivo (CHEN et al 2011; FAHMY et al., 2013; ERPICUM et al., 2017) o que pode ter comprometido a redução do estresse oxidativo na IRR, já que a expansão celular ocasiona células senescentes com acúmulo de estresse oxidativo, prejuízo na sua capacidade migratória, desequilíbrio de fatores reguladores de diferenciação e redução da atividade de modulação imunológica (TURINETTO; VITALE; GIACHINO, 2016).

O transplante de células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas da medula óssea é benéfico para o tratamento em lesão renal aguda (LRA), incluindo IRR com a capacidade de migrar para o local e de estimular o reparo por mecanismos parácrinos sem se diferenciar nas células lesadas (HU; ZOU, 2017). Contudo, LIU et al. (2015) relataram que a hipóxia local, o estresse oxidativo e inflamação no tecido isquêmico dificulta a quimiotaxia de CTM transplantadas com a baixa sobrevivência celular reduzindo seus efeitos terapêuticos.

Os danos ao DNA elevados no GE1 sugerem que a vida útil da célula esta comprometida em meio ao estresse oxidativo causado pela IRR afetando a eficácia do tratamento. Este estudo condiz com os achados de Brunswig-Spickenheier et al. (2010) que relatam que a utilização de CTM no tratamento de IRR em suínos não promove efeito renoprotetor como nos estudos em ratos, sem melhoria da função renal e nem efeito modulador sobre a inflamação.

O efeito da CTM é conhecido por ser parácrino, como observado nesse estudo, em que as mesmas se encontravam no interstício renal com efeitos anti-apoptóticos e pró-angiogênico. Entretanto, a proteção mediada por meio da diferenciação direta de CTM em células epiteliais *in vivo*, não ocorre ou apresenta-se com pouca frequência, e quando encontrados é citado falhas na

diferenciação das CTM alojadas em glomérulos (TOGEL et al., 2005; KUNTER et al., 2007). Apesar desse estudo não ter identificado a diferenciação de CTM no rim, este processo pode intervir no aumento no dano ao DNA (LAMBERT et al., 2011), sendo esta outra possível causa do aumento de frequência e índice de danos por CTM.

A CPR demonstrou propriedades genoprotetoras ampliadas o que sugere ser resultado da proliferação dessas células após uma lesão tubular, tornando-se parte predominante do epitélio regenerador observado no rastreamento dessas células nos túbulos, glomérulos e interstício renais, assim como observado em danos tubular agudo por Angelotti et al. (2012).

Em estudos comparativos da CPR e CTM como o de Grange et al., (2014) usando CTR da medula interna de rim humano em um modelo de dano tubular agudo induzido pelo glicerol em ratos, houve recuperação da função renal, prevenindo a necrose das células tubulares e estimulando a proliferação e sobrevivência das células residentes, semelhante às CTM, ainda, com as CPR apresentando efeito renoprotetor. Enquanto, Bezerra (2018), identificou por análise histopatológica e dosagem de citocinas sistêmica que as células progenitoras renais promovem melhor efeito renoprotetor e imunomodulador do que célula-tronco mesenquimais na síndrome de IRR em suínos. Neste estudo, a CTM e CPR apresentou melhorias na apoptose e angiogênese por possível ação parácrina. Entretanto as CTM não reduziram o estresse oxidativo e os danos ao DNA, enquanto a CPR demonstrou-se responsiva ao ambiente em estresse oxidativo e genoprotetora.

## **5. CONCLUSÃO**

Com base nos achados *in situ* do rim suíno após isquemia-reperfusão foi observado efeitos pró-angiogênicos e anti-apoptóticos nos animais tratados com células-tronco mesenquimais e células progenitoras renais e, referentemente a depleção do estresse oxidativo e danos ao DNA, o tratamento com células progenitoras renais, demonstrou maior eficácia.

## 6. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S. et al. Human CD133+ renal progenitor cells induce erythropoietin production and limit fibrosis after acute tubular injury. **Scientific Reports**, v. 6, p. 37270, 2016.

ANGELOTTI, M. L. et al. Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. **Stem Cells**, v. 30, n. 8, p. 1714-1725, 2012.

BEZERRA, D. O. **Uso terapêutico de células-tronco mesenquimais e células progenitoras renais na síndrome de isquemia/reperfusão renal em suínos**. 2018. 58f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

BECHERUCCI, F. et al. Regenerating the kidney using human pluripotent stem cells and renal progenitors. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 18, n. 7, p. 795-806, 2018.

BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B. et al. Limited immune-modulating activity of porcine mesenchymal stromal cells abolishes their protective efficacy in acute kidney injury. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 5, p. 719-729, 2010.

CAO, H. et al. Mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord ameliorate ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 5, p. 725-732, 2010.

CARVALHO, I.M.C.M.M. et al. Genotoxicity of sodium metabisulfite in mouse tissues evaluated by the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 720, n. 1, p. 58-61, 2011.

CHANCE, B.; MAEHLY, A. C. [136] Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-775, 1955.

CHEN, Y.T. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1, 2011.

CHUNG, H.C. et al. Cell-based therapy for kidney disease. **Korean Journal of Urology**, v. 56, n. 6, p. 412-421, 2015.

COSTA, C. R. M. et al. Labeling of adipose-derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent signal for ex vivo cell tracking. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 53, n. 4, p. 363-370, 2017.

DA SILVA, J., FREITAS, T. R. O., MARINHO, J. R., SPEIT, G., AND ERDTMANN, B. An alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics molecular biology**, v.23, n.1, p.241-245, 2000.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, 186, 421-431, 1990.

ERPICUM, P. et al. Administration of mesenchymal stromal cells before renal ischemia/reperfusion attenuates kidney injury and may modulate renal lipid metabolism in rats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8687, 2017.

FAHMY, S. R. et al. Therapeutic efficacy of human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation against renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Tissue and Cell**, v. 49, n. 3, p. 369-375, 2017.

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, 2014.

GREEN, LC; TANNENBAUM, SR; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56-58, 1981.

HU, H.; ZOU, C. Mesenchymal stem cells in renal ischemia-reperfusion injury: Biological and therapeutic perspectives. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 3, p. 183-187, 2017.

KELLUM, J. A.; UNRUH, M. L.; MURUGAN, R. Acute kidney injury. **BMJ Clinical Evidence**, v. 2011, 2011.

KO, E.; LEE, K. Y.; HWANG, D. S. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells undergo cellular senescence in response to oxidative stress. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 11, p. 1877-1886, 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

KUNTER, U. et al. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, n. 6, p. 1754-1764, 2007.

LAMBERT, A. P. F. et al. The Role of DNA Damage and Repair Proteins in Adipose-Derived Adult Stem Cell Differentiation in Neural-Like Cells. **Journal of Tissue Science and Engineering**, v. 2, n. 109, p. 2, 2011.

LIANG, X. et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. **Cell transplantation**, v. 23, n. 9, p. 1045-1059, 2014.

LIU, H. et al. The role of SDF-1-CXCR4/CXCR7 axis in the therapeutic effects of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells for renal ischemia/reperfusion injury. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e34608, 2012.



- LIU, N. et al. Alleviation of apoptosis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the acute injured kidney by heme oxygenase-1 gene modification. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 69, p. 85-94, 2015.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MALEK, M.; NEMATBAKHS, M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. **Journal of Renal Injury Prevention**, v. 4, n. 2, p. 20, 2015.
- MASOUD, M. S. et al. Pre-conditioned mesenchymal stem cells ameliorate renal ischemic injury in rats by augmented survival and engraftment. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 243, 2012.
- MIAS, C. et al. Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. **Stem Cells**, v. 26, n. 7, p. 1749-1757, 2008.
- NOIRI, E. et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 281, n.5, p. 948-57, 2018.
- SALVADORI, M.; ROSSO, G.; BERTONI, E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. **World Journal of Transplantation**, v. 5, n. 2, p. 52, 2015.
- SEDLAK, J; LINDSAY, RH. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman`s reagent. **Analytical Biochemistry**, 25, 192-205, 1988.
- SENSEBE, L. et al. Mesenchymal stem cells for clinical application. **Vox Sanguinis**, v. 98, n. 2, p. 93-107, 2010.
- TAAL, M. W.; CHERTOW, G. M.; MARSDEN, P. A.; SKORECKI, K.; ALAN, S. L.; BRENNER, B. M. Brenner & Rector`s. The Kidney 9th Edition, Patrick H. Nachman, J. Charles Jennette, and Ronald J. Falk, **Primary Glomerular Disease**. Cap 31, 9th, Edit. Elsevier Saunders, 2012.
- TOGEL, F. et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 289, n. 1, p. F31-F42, 2005.
- TUFRO, A.; VERON, D. VEGF and podocytes in diabetic nephropathy. **Seminutis Nephrol.** v. 32, n.4, p. 385-393, 2012.
- TURINETTO, V.; VITALE, E.; GIACHINO, C. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1164, 2016.

VRIES, D. K. et al. Oxidative damage in clinical ischemia/reperfusion injury: a reappraisal. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 6, p. 535-545, 2013.

ZHOU, Y. et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 2, p. 34, 2013.

## CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho demonstrou contribuição para o conhecimento de células-tronco mesenquimais e progenitoras renais quanto às alterações na cultura dessas células durante sua expansão *in vitro* indicando as melhores passagens devido ao interesse crescente de seu uso potencial para terapia de uma variedade de doenças. Desta forma, se faz necessários estudos direcionados aos mecanismos biológicos das células quanto à manutenção da estabilidade do microambiente do cultivo celular, bem como compreender as limitações de aplicações de células senescentes, para melhor dinâmica e economia na produção de células em quantidade suficientes para terapia celular.

Quanto ao ensaio *in situ* no rim podem-se indicar linhagens mais adequadas para o controle do estresse oxidativo e danos ao DNA na regeneração das lesões da isquemia-reperfusão renal e buscar abranger mais experimentos quanto à associação dos fatores envolvendo a escolha da linhagem celular, ao tempo de expansão, a espécie animal e ao tipo de doença para que possa assegurar com maior precisão e redução dos riscos na utilização de células-tronco como alternativa de aplicação clínica.

## REFERÊNCIAS

- AIELLO, S. et al. Rabbit anti-rat thymocyte immunoglobulin preserves renal function during ischemia/reperfusion injury in rat kidney transplantation. **Transplant International**, v. 24, n. 8, p. 829-838, 2011.
- ALFARANO, C. et al. Intraparenchymal injection of bone marrow mesenchymal stem cells reduces kidney fibrosis after ischemia-reperfusion in cyclosporine-immunosuppressed rats. **Cell transplantation**, v. 21, n. 9, p. 2009-2019, 2012.
- ALLAMEH, A. et al. Role of Glutathione in Balancing Total Antioxidant Status and Generation of Reactive Oxygen Species during Hepatic Differentiation of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Stem Cells**, v. 13, n. 2, p. 83-93, 2018.
- ALMEIDA, D. C. et al. In search of mechanisms associated with mesenchymal stem cell-based therapies for acute kidney injury. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 34, n. 3, p. 131, 2013.
- ANDRZEJEWSKA, A.; LUKOMSKA, B.; JANOWSKI, M. Mesenchymal stem cells: from roots to boost. **Stem Cells**. 2019.
- ANGELOTTI, M. L. et al. Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. **Stem Cells**, v. 30, n. 8, p. 1714-1725, 2012.
- ATASHI, F.; MODARRESSI, A.; PEPPER, M. S. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 10, p. 1150-1163, 2015.
- BANAEI, S. Novel role of microRNAs in renal ischemia reperfusion injury. **Renal Failure**, v. 37, n. 7, p. 1073-1079, 2015.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BAULIER, E. et al. Amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells prevent fibrosis and preserve renal function in a preclinical porcine model of kidney transplantation. **Stem Cells Translational Medicine**, p. sctm. 2013-0186, 2014.
- BASILE, D. P. et al. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, 2018.
- BEZERRA, D. O. **Uso terapêutico de células-tronco mesenquimais e células progenitoras renais na síndrome de isquemia/reperfusão renal em suínos**. 2018. 58f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

BIANCHI, F. et al. Potential advantages of acute kidney injury management by mesenchymal stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 5, p. 644, 2014.

BIRCH-MACHIN, M. A.; BOWMAN, A. Oxidative stress and ageing. **British Journal of Dermatology**, v. 175, p. 26-29, 2016.

BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B. et al. Limited immune-modulating activity of porcine mesenchymal stromal cells abolishes their protective efficacy in acute kidney injury. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 5, p. 719-729, 2010.

BUSSOLATI, B.; CAMUSSI, G. Therapeutic use of human renal progenitor cells for kidney regeneration. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 12, p. 695, 2015.

CARRADE, D. D.; BORJESSON, D. L. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. **Comparative Medicine**, v. 63, n. 3, p. 207-217, 2013.

CASTELLANO, G. et al. Therapeutic targeting of classical and lectin pathways of complement protects from ischemia-reperfusion-induced renal damage. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 4, p. 1648-1659, 2010.

CAU, J. et al. FR167653 improves renal recovery and decreases inflammation and fibrosis after renal ischemia reperfusion injury. **Journal of vascular surgery**, v. 49, n. 3, p. 728-740, 2009.

CHEN, Y.T. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1, 2011.

CHUNG, H.C. et al. Cell-based therapy for kidney disease. **Korean Journal of Urology**, v. 56, n. 6, p. 412-421, 2015.

CIEŚLAR-POBUDA, A. et al. ROS and oxidative stress in stem cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

CORNÉLIO, D. A.; MEDEIROS, S. R. B. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, n. 4, p. 238-240, 2014.

COSTA, C. R. M. et al. Labeling of adipose-derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent signal for ex vivo cell tracking. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 53, n. 4, p. 363-370, 2017.

DENU, R. A.; HEMATTI, P. Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2989076, 2016.

DREHMER, D. L. et al. Metabolic switches during the first steps of adipogenic stem cells differentiation. **Stem Cell Research**, v. 17, n. 2, p. 413-421, 2016.

ENDRE, Z.H. et al. Differential diagnosis of AKI in clinical practice by functional and damage biomarkers: workgroup statements from the tenth Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference. In: **ADQI Consensus on AKI Biomarkers and Cardiorenal Syndromes**. Karger Publishers, 2013. p. 30-44.

EIRIN, A. et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Revascularization Outcomes to Restore Renal Function in Swine Atherosclerotic Renal Artery Stenosis. **Stem Cells**, v. 30, n. 5, p. 1030-1041, 2012.

FURUICHI, K. et al. Effects of adipose-derived mesenchymal cells on ischemia–reperfusion injury in kidney. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 16, n. 5, p. 679-689, 2012.

GOLRIZ, M. et al. Pig kidney transplantation: an up-to-date guideline. **European Surgical Research**, v. 49, n. 3-4, p. 121-129, 2012.

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, 2014.

GU, Y. et al. Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 6, p. 5207-5215, 2016.

GUERRA JUNIOR, A.A. et al. Ciclosporina versus tacrolimus no transplante renal no Brasil: uma comparação de custos Cyclosporine versus tacrolimus in kidney transplants in Brazil: a cost comparison. **Caderno de Saúde Pública**, v. 26, n. 1, p. 163-174, 2010.

GUIMARÃES-SOUZA, N.K. et al. Produção aumentada de superóxido e fibrose renal: novo modelo animal. **Einstein (16794508)**, v. 13, n. 1, 2015.

HARE, I. et al. In vitro expansion of bone marrow derived mesenchymal stem cells alters DNA double strand break repair of etoposide induced DNA damage. **Stem cells International**, v. 2016, 2016.

HILL, A. B. T. et al. Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 44, 2019.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

JHA, N. et al. Generation and role of reactive oxygen and nitrogen species induced by plasma, lasers, chemical agents, and other systems in dentistry. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

KESHARI, A. K. et al. Oxidative stress: A review. **The International Journal of Science and Technoledge**, v. 3, n. 7, p. 155, 2015.

KEZIC, A. et al. Mitochondria-Targeted Antioxidants: Future Perspectives in Kidney Ischemia Reperfusion Injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 12p. 2016.

KOBAYASHI, C. I.; SUDA, T. Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 2, p. 421-430, 2012.

KOBOLAK, J. et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. **Methods**, v. 99, p. 62-68, 2016.

LAMBERT, A. P. F. et al. The Role of DNA Damage and Repair Proteins in Adipose-Derived Adult Stem Cell Differentiation in Neural-Like Cells. **Journal of Tissue Science and Engineering**, v. 2, n. 109, p. 2, 2011.

LIU, H. et al. Original article anti-oxidant pathways are stimulated by mesenchymal stromal cells in renal repair after ischemic injury. **Cytotherapy**, v. 14, n. 2, p. 162-172, 2012.

LIU, N. et al. Alleviation of apoptosis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the acute injured kidney by heme oxygenase-1 gene modification. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 69, p. 85-94, 2015.

MA, S. et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, n. 2, p. 216, 2014.

MALEK, M.; NEMATBAKHSI, M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. **Journal of Renal Injury Prevention**, v. 4, n. 2, p. 20-27, 2015.

MCKEE, C.; CHAUDHRY, G. RASUL. Advances and challenges in stem cell culture. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 62-77, 2017.

MENEZES, L.B. et al. Avaliação do efeito da clorpromazina sobre a função renal de cães submetidos à isquemia e reperfusão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 108-114, 2010.

MENKE, J. et al. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 19, n. 4, p. 395-400, 2014.

MOON, K. H. et al. Kidney diseases and tissue engineering. **Methods**, v. 99, p. 112-119, 2016.

NOIRI, E. et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, 2018.

OLIVER, L. et al. Differentiation-related response to DNA breaks in human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 31, n. 4, p. 800-807, 2013.

- PALLET, N.; THERVET, E.; TIMSIT, M.-O. Angiogenic response following renal ischemia reperfusion injury: new players. **Progrès en Urologie**, v. 24, p. S20-S25, 2014.
- PIRES, L. F. et al. Determinação dos níveis de malonaldeído e nitrito em indivíduos portadores de traço falciforme. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 1, p. 65-69, 2013.
- PODEROSO, J. J.; HELFENBERGER, K.; PODEROSO, C. The effect of nitric oxide on mitochondrial respiration. **Nitric Oxide**, v. 88, n.1, p. 61-72 2019.
- REINDERS, M. E. J; FIBBE, W. E.; RABELINK, T. J. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. **Nephrology Dialysis Transplant**. v.25, n.1, p.17-24. 2010.
- REQUIÃO-MOURA, L.R. et al. Lesão de isquemia e reperfusão no transplante renal: paradigmas hemodinâmico e imunológico. **Einstein (16794508)**, v. 13, n. 1, 2015.
- ROEMELING-VAN RHIJN, M. et al. Culture expansion induces non-tumorigenic aneuploidy in adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 15, n. 11, p. 1352-1361, 2013.
- ROJEWSKI, M. T.; WEBER, B. M.; SCHREZENMEIER, H. Phenotypic characterization of mesenchymal stem cells from various tissues. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 35, n. 3, p. 168-184, 2008.
- SALVADORI, M.; ROSSO, G.; BERTONI, E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. **World Journal of Transplantation**, v. 5, n. 2, p. 52, 2015.
- SAREEN, N. et al. Early passaging of mesenchymal stem cells does not instigate significant modifications in their immunological behavior. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 121, 2018.
- SATO, K. et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 228-234, 2007.
- SCHROPPEL, B.; LEGENDRE, C. Delayed kidney graft function: from mechanism to translation. **Kidney International**, v. 86, n. 2, p. 251-258, 2014.
- SHARFUDDIN, A.A.; MOLITORIS, B. A. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Nature Reviews Nephrology**, v. 7, n. 4, p. 189-200, 2011.
- SI, Z. et al. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 114, 108765, 2019.
- SOLATI, Z. et al. Oxidized phosphatidylcholines are produced in renal ischemia reperfusion injury. **PLoS One**, v. 13, n. 4, e0195172, 2018.



- SPRADA, A. G. et al. Toxicity and oxidative stress of canine mesenchymal stromal cells from adipose tissue in different culture passages. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 15-20, 2015.
- SURESHBABU, A.; RYTER, S. W.; CHOI, M. E. Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury. **Redox Biology**, v. 4, p. 208-214, 2015.
- VITALE, I.; et al. DNA damage in stem cells. **Molecular Cell**, v. 66, n. 3, p. 306-319, 2017.
- TORRE, M. L. et al. Ex vivo expanded mesenchymal stromal cell minimal quality requirements for clinical application. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 6, p. 677-685, 2014.
- TRACHANA, V. et al. Human mesenchymal stem cells with enhanced telomerase activity acquire resistance against oxidative stress-induced genomic damage. **Cytotherapy**, v. 19, n. 7, p. 808-820, 2017.
- TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical Biochemistry**, v. 524, p. 13-30, 2017.
- TURINETTO, V.; VITALE, E.; GIACHINO, C. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1164, 2016.
- YAMALEYEVA, L. M. et al. Cell therapy with human renal cell cultures containing erythropoietin-positive cells improves chronic kidney injury. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, n. 5, p. 373-383, 2012.
- YAMAKI, V. N. et al. Protective effect of remote ischemic pre-conditioning in the ischemia and reperfusion-induced renal injury in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 6, p. 529-533, 2012.
- YOSHIDA, J. et al. Ex vivo Application of Carbon Monoxide in UW Solution Prevents Transplant-Induced Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Pigs. **American Journal of Transplantation**, v. 10, n. 4, p. 763-772, 2010.
- WEI, Q. et al. Targeted deletion of Dicer from proximal tubules protects against renal ischemia-reperfusion injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 21, n. 5, p. 756-761, 2010.
- WEIDINGER, A.; KOZLOV, A.. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 472-484, 2015.

ZHU, X.Y. et al. Mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells decrease renal injury in experimental swine renal artery stenosis through different mechanisms. **Stem Cells**, v. 31, n. 1, p. 117-125, 2013.

ZHUO, W. et al. Efficiency of endovenous versus arterial administration of mesenchymal stem cells for ischemia-reperfusion-induced renal dysfunction in rats. In: **Transplantation Proceedings**. Elsevier, p. 503-510. 2013.