

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NO TRATAMENTO DA  
LESÃO RENAL ISQUEMICA EM RATOS**

**BIANKA SOUZA DOS SANTOS**

**VILA VELHA**

**JULHO/2012**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NO TRATAMENTO DA  
LESÃO RENAL ISQUEMICA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado em Ciência Animal da  
Universidade Vila Velha para obtenção do  
título de Mestre em Ciência Animal.

**BIANKA SOUZA DOS SANTOS**

**VILA VELHA**

**JULHO/2012**

## Catalogação na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S237t Santos, Bianka Souza dos.

Transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo no tratamento da lesão renal aguda por isquemia e reperfusão em ratos / Bianka Souza dos Santos. – 2012.  
61 f.: il.

Orientadora: Betânia Souza Monteiro.

Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2012.  
Inclui bibliografias.

1. Transplante de órgãos, tecidos, etc. 2. Doença renal – Estágio terminal. 3. Isquemia. 4. Terapia celular. I. Monteiro, Betânia Souza. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.0896


**Bianka Souza dos Santos**

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS  
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NO TRATAMENTO DA  
LESÃO RENAL AGUDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM  
RATOS**

Dissertação apresentada a  
Universidade Vila Velha como pré-  
requisito do Programa de pós-  
graduação em Ciência Animal para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal.

Aprovada em 25 de julho de 2012.

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Tatiana Champion (UVV)

  
\_\_\_\_\_  
Daise Nunes Queiroz da Cunha (UFV)

  
\_\_\_\_\_  
Betânia Souza Monteiro (UVV) (Orientadora)

**Dedico este trabalho:**

À DEUS pela vida, à minha mãe por sempre me apoiar e guiar meu caminho, à minha família por sempre estar ao meu lado mesmo nos momentos em que estive ausente, aos meus professores por toda sua dedicação, paciência e conhecimento e à minha orientadora pelas sábias palavras e ensinamentos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pela concessão da bolsa que viabilizou meus estudos, dedicação e ao apoio financeiro ao projeto.

À Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular (FUNADESP) pelo financiamento do projeto.

À Universidade de Vila Velha, por possibilitar a realização do Mestrado em Ciência Animal.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo apoio técnico e pela disponibilização da estrutura física laboratorial.

À minha orientadora Betânia Souza Monteiro pelos ensinamentos e competência na orientação, por toda sua paciência, amizade, carinho e serenidade. Por todos os cafezinhos e almoços de trabalho. Agradeço por sua força de vontade e dedicação admirável o que a tornou referência para mim.

Aos Professores do Mestrado por toda atenção, ensinamentos e carinho dedicado.

Aos Professores da graduação e funcionários da UVV por toda paciência e disponibilidade.

À Professora Tatiana Champion por toda paciência, dedicação e profissionalismo.

Ao Professor Vinícius Ricardo Cuña de Souza e aos funcionários do Biotério Experimentação Animal por toda ajuda na manutenção dos animais.

Ao Professor Dominick Lenz e Professora Denise Coutinho Endringer, por estarem sempre dispostos e prontos a ajudar.

À Professora Daniela Campagnol e ao Professor Eduardo R. Monteiro por todos ensinamentos de anestesia e colaboração no projeto.

À Professora Flaviana Lima Guião Leite e ao Professor João Luiz Rossi Junior por partilharem seus conhecimentos e por serem sempre prestativos.

À Professora Flavia Mara Machado e a Médica Veterinária Caroline Saraiva Raimondi Lopes Silva pelo suporte técnico nas ultrassonografias dos animais.

As alunas de graduação e de iniciação científica Bruna Lopes e Emy Hiura e a amiga Gisele Valdetaro, pela ajuda e dedicação durante a execução do projeto.

Ao Pablo Herthel de Carvalho pelo auxílio laboratorial na cultura das células tronco mesenquimais.

Ao Carlos Roberto Marcos pela confecção das lâminas no setor de Patologia - UVV.

Ao Médico Veterinário Patologista Wagner Alexey Back Fiorio por todas as horas de conversa e ensinamentos.

A Terezinha e a todos os funcionários do Hospital Veterinário.

A minha mãe Rosane, ao meu pai Jorge e meus irmãos Ericke e Flávio por sempre ajudar sem medir esforços. Obrigada.

A Jacquelyne Motta e aos amigos da Prontovet<sup>®</sup> pelo incentivo e apoio.

A Andressa Nunes e aos meus amigos por me ajudarem em todos os momentos felizes e de mau humor.

Aos animais do projeto e aos que tornam meus dias melhores.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Ang II** = Angiotensina II

**ATP** = Adenosina trifosfato

**CTM** = Células-tronco mesenquimais

**CD** = grupo de diferenciação (*cluster of differentiation*)

**CO<sub>2</sub>** = Dióxido de carbono

**DMEN** = meio Dulbecco's

**DRA** = Doença renal aguda

**DRC** = Doença renal crônica

**ECA** = Enzima conversora de angiotensina

**GFP** = Proteína fluorescente verde

**HE** = hematoxilina e eosina

**HGF** = Fator de crescimento hepatóide

**IDO** = Enzima indoleamine 2,3-dioxygenase

**IL** = Interleucinas

**IM** = Intramuscular



**MHC** = Complexo de histocompatibilidade principal

**MPA** = Medicação pré anestésica

**PGE** = Prostaglandina E

**PBS** = Tampão fosfato salino

**PSA** = Solução de penicilina, estreptomicina e anfotericina

**PVPI** = Iodopovidona

**RAA** = Sistema renina-angiotensina-aldosterona

**TGF-  $\beta$**  = Fator de crescimento transformador beta

**US** = Ultrassonografia

**UV** = Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Clipes vascular utilizados durante a celiotomia pré-umbilical paramediana dos ratos.	26
Figura 2- Cano de policloreto de vinila de 7,0 cm de diâmetro e 20,0 cm de extensão, com tampas perfuradas em ambas extremidades para facilitar a entrada de ar e a contenção da cauda do animal.	28
Figura 3 - Avaliação fenotípica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratos Lewis eGFP, por citometria de fluxo. A) Gráfico de granulocidade (SSC) versus tamanho (FSC) demonstrando a população celular selecionada para estudo (R1). B a G) Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro da população selecionada (R1), com os anticorpos anti-CD90, anti-CD73, anti-CD45, anti-CD11, anti-MHC I e anti-MHC-II, respectivamente	33
Figura 4 - Cultura de células submetidas à diferenciação osteogênica A e B) Pontos de calcificação da matriz e células diferenciadas com aparência mais arredondada. Nódulos de mineralização amarronzados ou negros na coloração de Von Kossa, aos 30 <sup>o</sup> dia, comprovando a diferenciação em osteoblastos das CTM cultivadas.	33
Figura 5- Celiotomia pré-umbilical paramediana em rato. A) Evidência para coloração vermelho brilhante do parênquima renal (seta), exibido anteriormente à obstrução dos vasos renais. B). Evidência para coloração vermelho escurecido do parênquima renal (seta), exibido posteriormente à obstrução dos vasos renais com o clipe vascular (seta tracejada).	35

- Figura 6- Mapeamento com Doppler colorido da região hilar renal, demonstrando a hemodinâmica nessa região. A direção do fluxo, em relação ao transdutor, apresentou coloração vermelha e, na direção contrária, coloração azul 36
- Figura 7 – Aspecto macroscópico renal de ratos Wistars, do grupo sham, exibindo coloração vermelha brilhante do parênquima renal, semelhante ao rim normal, com preservação das regiões de cortical e medular. 39
- Figura 8 – Aspecto macroscópico renal de ratos Wistars submetidos obstrução da artéria e veia renais, aos 31 dias de avaliação pós-tratamento. 41
- Figura 9 – Fotomicrografia representando animal do grupo Sham. Presença de túbulos renais de arquitetura preservada e uniforme e células tubulares nucleadas. 42
- Figura 10 – Fotomicrografia representando animal do grupo 10. Presença de dilatação tubular, com acúmulo de cilindros hialinos, arquitetura tecidual preservada com túbulos e glomérulos disformes. 42
- Figura 11- Fotomicrografia renal demonstrando aspectos histológicos dos diferentes grupos experimentais, aos 31 dias. 45
- Figura 12- Fotomicrografia da região medular renal sob microscopia de fluorescência. 47
- Figura 13- Demonstração gráfica da avaliação estatística do grau de necrose, dos grupos experimentais. 48
- Figura 14- Demonstração gráfica da avaliação estatística do grau de dilatação tubular, dos grupos experimentais. 48
- Figura 15- Demonstração gráfica da avaliação estatística do percentual de cilindros hialinos no interior dos túbulos renais, dos grupos experimentais. 49

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Lesão de isquemia/reperfusão renal	16
2.2 Terapia celular	18
3 OBJETIVOS	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Experimentação <i>in vitro</i>	21
4.1.1 Animais de experimentação	21
4.1.2 Cultura celular	21
4.1.3 Caracterização celular	23
4.1.4 Diferenciação osteogênica	23
4.1.5 Preparo das células para transplante	24
4.2 Experimentação <i>in vivo</i>	24
4.2.1 Animais de experimentação	24
4.2.2 Procedimentos anestésicos, cirúrgicos e tratamentos	25

4.2.3 Avaliação ultrassonografica bidimensional e com Doppler colorido	28
4.2.4 Mensurações de ureia e creatinina	29
4.2.5 Procedimentos histológicos	30
4.2.6 Avaliação estatística	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Cultura celular	32
5.2 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos	34
5.3 Avaliações clínicas	35
5.4 Avaliações ultrassonográficas bidimensional e com Doppler colorido	36
5.5 Mensurações de ureia e creatinina	37
5.6 Avaliação histopatológica	39
5.6.1 Aspecto macroscópico após nefrectomia	39
5.6.2 Aspecto microscópico após nefectomia	41
5.7 Avaliação estatística	46
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

SANTOS, BS. **Transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo no tratamento de doença renal aguda em ratos.** [Dissertação de Mestrado]. Vila Velha: Pós-Graduação em Ciência Animal, UVV – Universidade Vila Velha, 2012.

## RESUMO

Estudos têm sugerido que o transplante de células-tronco mesenquimais contribui para a regeneração renal, principalmente, por mecanismos parácrinos. Norteados por essa afirmação, o trabalho objetivou avaliar a reparação renal em ratos acometidos por infarto renal induzidos por obstrução do fluxo sanguíneo da artéria renal e tratados por transplante de células-tronco mesenquimais, após 24 ou 48 horas da isquemia. Para o estudo *in vitro*, utilizou-se três ratos Lewis transgênicos para proteína verde fluorescente de 4 semanas de idade, dos quais foram coletados o tecido adiposo para a realização da cultura e expansão celular. Para o estudo *in vivo*, utilizou-se 72 ratos Wistar, de 16 semanas de idade. Procedeu-se celiotomia pré-umbilical paramediana esquerda, localização do rim e identificação dos vasos sanguíneos, seguida de clipagem da artéria e veia renais, por 24 horas. Após esse tempo, realizou-se a remoção do clipe vascular e avaliações macroscópica da coloração do rim no transcirúrgico e avaliação com Doppler colorido ao término da cirurgia. No pós cirúrgico, os animais foram identificados e alocados em dez grupos experimentais homogêneos, correspondendo aos tratamentos com tampão fosfato-salina (PBS) ou células-tronco mesenquimais (CTM), tempo da aplicação (24 ou 48 horas) e local do transplante (veia lateral da cauda ou intrarrenal). Após a realização dos tratamentos, quatro animais de cada grupo submetidos a nefrectomia esquerda e eutanásia, aos 8 e 31 dias, para realização do estudo histológico. Macroscopicamente durante a isquemia observou-se mudança da coloração do parênquima renal para vermelho escurecido retornando a coloração vermelho brilhante após a remoção do clipe. Durante as eutanásias, constatou nos grupos não tratados com CTM, rins de coloração pálida e nos grupos tratados, coloração avermelhada próximo da normal. Histologicamente, observou-se maior quantidade de debris celulares e túbulos desprovidos de epitélio acompanhados de maior grau de necrose, nos grupos não tratados com CTM, confrontando com baixo grau de necrose e maior vascularização tubular observados nos grupos tratados. Sob as condições que foram realizadas esse experimento, constata-se que o transplante de CTM derivadas de tecido adiposo, contribuiu positivamente para a substituição do tecido necrótico por células tubulares renais, vascularização do parênquima renal e restabelecimento funcional do órgão, sobretudo no transplante realizado intrarrenal, 48 horas após a reperfusão.

**Palavras-Chave:** cultura celular, isquemia, janela terapêutica, mecanismos parácrinos, propriedades imunológicas, terapia celular.

**SANTOS,BS Transplation of mesenchymal stem cells derived from fat in the treatment of acute renal failure of rats.** [Masters Dissertation] Vila Velha, Master's Degree Program in Animal Science, UVV- University of Vila Velha, 2012.

## **ABSTRACT**

Studies suggest that the transplant of mesenchymal stem cells contributes to renal repair, especially, by paracrine mechanisms. Guided by this statement, the research aimed estimate the renal repair of rats affected by renal infarct induced by obstruction of blood flow of the renal artery and treated by transplant of mesenchymal stem cells, after 24 or 48 hours of ischemia. For the in vitro study, was used three transgenic mice Lewis for fluorescent green protein of 4 weeks of age, from which were collected the adipose tissue to achieve the culture and cellular expansion. For the in vitro study, was used 72 Wistar mice, of 16 weeks of age. Proceeded paramedian preumbilical celiotomy, location of the kidney and identification of the blood vessels, followed clamping the artery and renal vein, for 24 hours. After this time was performed the removal of the vascular clip and microscopic evaluation of the color of the kidney, in the trans-surgical and vascular ultrasonography (US) at the end of the surgery.in post surgical the animals were identified and placed in ten experimental groups, corresponding to treatments with phosphate buffered saline (PBS) or mesenchymal stem cells (MSC), time of application (24 or 48 hours) and spot of transplantation (lateral vein or intrarenal). After the treatments, four animals of each group were submitted to left nephrectomy and euthanasia, at 8 and 31 days, to achieve the histologic study. Macroscopically during ischemia was noticed color change of the renal parenchyma from dark red to bright red after the removal of the clip. During euthanasia was found in the groups not treated with MSC, pale kidneys and the groups treated with MSC, kidneys with red color near to normal. Histologically, observed a higher amount of cellular debris and tubules devoid of epithelium accompanied by higher degree of necrosis in groups not treated with MSC, confronted with a low degree of necrosis and increased tubular vascularization observed in groups treated with MSC. Under the conditions that were performed this experiment, it was found that transplantation of MSC derived from adipose tissue contributed positively to necrotic tissue replacement by renal tubular cells, vascularization of the renal parenchyma and functional recovery of the organ, especially in intrarenal transplantation performed 48 hours after reperfusion.

**Key Word:** cellular culture, ischemia, therapeutic window, paracrine mechanisms, immunological properties, cellular therapy.

## 1 INTRODUÇÃO

Os rins são órgãos vitais e desempenham importantes funções como a eliminação de toxinas; reabsorção e excreção de íons e produção de hormônios que participam da produção de glóbulos vermelhos e da manutenção da homeostase sanguínea pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona e hormônio antidiurético (Sodré et al., 2007; Ribeiro et al., 2008). Quando o rim apresenta incapacidade em desempenhar essas funções, o paciente poderá desenvolver um quadro clínico característico de doença renal (Bywaters & Beall, 1941; Schrier et al., 2004).

As doenças renais causam grande morbidade e mortalidade em pacientes humanos e veterinários e necessitam de tratamentos de custos elevados com medicações, internações, hemodiálises e/ou transplantes, cujos resultados nem sempre são satisfatórios (Bellomo et al., 2001; Humphreys & Bonventre, 2008).

Na doença renal aguda (DRA) há redução da função renal em horas ou dias, acarretando diminuição da taxa de filtração glomerular e disfunções no controle do equilíbrio hidroeletrolítico e ácido-básico (Schrier et al., 2004; Ribeiro et al., 2008). Na doença renal crônica (DRC) há perda progressiva e irreversível da função de filtração glomerular e consequente sobrecarga dos demais sistemas do organismo, secundária ao acúmulo de catabólitos e alterações do equilíbrio hidroeletrolítico e ácido-básico (Ribeiro et al., 2008).

Uma das principais causas pré-renais de lesões agudas são aquelas secundárias a isquemia após episódios de hipotensão e as de origem iatrogênica, por pinçamento da artéria e/ou veia renais (Konopka et al., 2007; Humphreys & Bonventre, 2008). A isquemia gera necrose e apoptose das células tubulares e alteração na polaridade e integridade da barreira tubular.



O rim inicia um processo de reparação que é dependente da extensão e tempo decorridos após a lesão isquêmica (Thadhani et al., 1996).

Pesquisas preconizando terapia celular, com o objetivo de encontrar soluções para o limitado potencial de reparação renal e fornecer alternativa para tratamento vem sendo empreendidas no mundo todo. Alguns estudos têm sugerido que o transplante de células-tronco mesenquimais (CTM) contribui para a reparação renal, principalmente por mecanismos parácrinos (Kale et al., 2003; Bi et al., 2007; Wan et al., 2008). No Brasil, as pesquisas envolvendo terapias reparativas com células-tronco evoluem a cada dia, e os resultados encontrados e as possibilidades terapêuticas dessas células são promissoras (Del Carlo et al., 2009).

As CTM são multipotentes e possuem a capacidade de se diferenciar gerando diferentes tipos celulares necessários a processos de reparação do organismo (Pittenger et al., 1999). Apresentam mecanismos complexos de interação celular, por meio da liberação de fatores de crescimento e de forma parácrina com as células do sistema imune do organismo (Corcione et al., 2006; Nauta & Fibbe, 2007). Dentre esses fatores, estão as prostaglandinas (PGE2), interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento hepatóide (HGF) e a enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (Nauta & Fibbe, 2007).

Diante dos resultados promissores e da existência de perguntas que precisam ser respondidas, mormente quanto à capacidade reparadora e imunossupressora dessas células, justificam-se novos estudos que objetivam investigar e esclarecer a ação das CTM no restabelecimento da função renal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Lesão de isquemia/reperfusão renal

A DRA é caracterizada pelo rápido declínio da função renal, resultando em decréscimo da taxa de filtração glomerular, retenção de compostos nitrogenados e na incapacidade dos rins em exercer a manutenção da homeostase hidroeletrólítica do organismo (Schrier et al., 2004; Abuelo, 2007; Ribeiro et al., 2008; Singh et al., 2012). Essa lesão aguda pode ser secundária a causas pré-renais, renais e pós-renais, envolvendo a instabilidade hemodinâmica, hipovolemia, arteriosclerose, terapia diurética, falência cardíaca congestiva, peritonite, hipóxia, isquemia, reperfusão, entre outras (Jacob, 2003; Konopka et al., 2007; Humphreys & Bonventre, 2008).

Quando os rins são acometidos pela hipoperfusão e redução do aporte de oxigênio, as células tubulares passam a utilizar as reservas de adenosina trifosfato (ATP) e, conseqüentemente, manifestam falhas nas bombas de sódio-potássio e sódio-cálcio-ATPase (Devarajan, 2006; Abuelo, 2007). As concentrações intracelulares de sódio e cálcio se elevam e aumenta a pressão osmótica, causando intumescimento celular, necrose tubular aguda e apoptose das células epiteliais renais (Devarajan, 2006; Singh et al., 2012). Por sua vez, a morte destas células do parênquima renal e vasos sanguíneos prejudicam ainda mais a excreção dos metabólitos, aumentando na concentração de ureia e creatinina no organismo (Abuelo, 2007).

Em resposta a essa hipoperfusão tecidual, os rins estimulam a ativação de recursos autoregulatórios para minimizar a hipóxia medular e lesão tubular, tais como a vasodilatação induzida pelo o sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA), prostaglandinas e óxido nítrico ( Schrier et al., 2004).

A ativação do sistema RAA inicia-se pela liberação de renina, uma aspartil-protease, pelo aparelho justaglomerular, que quebra o angiotensinogênio

liberado pelo fígado, produzindo a angiotensina-I. Na presença da enzima conversora da angiotensina (ECA), a angiotensina-I é convertida em angiotensina-II (Ang-II) (Ferreira et al., 2001), que no córtex adrenal, estimula a secreção de aldosterona. A Ang-II atua em receptores específicos estimulando a secreção hormonal, como, por exemplo, a liberação de vasopressina para o controle central da pressão arterial. A aldosterona aumenta a taxa de reabsorção de sódio e fluido além de controlar a filtração glomerular e restabelece a microcirculação cortical e medular (reperfusão) (Ferreira et al., 2001; Tumelero et al., 2005).

O gasto das reservas de ATP também desencadeia uma série de alterações morfológicas e de metabolismo das células, ativando a produção de protease e fosfolipases nocivas ao organismo, que juntamente com a reintrodução do oxigênio no tecido isquêmico durante a reperfusão, acarreta em injúria oxidativa das células tubulares e células endoteliais dos capilares peritubulares (Butcher et al., 1991; Devarajan, 2006; Abuelo, 2007). Há um aumento do afluxo de leucócitos para o tecido, liberação de citocina citotóxicas, enzimas proteolíticas e de radicais livres de oxigênio e, que pioram a lesão do parênquima renal (Quintães & Noronha 1998; Devarajan, 2006).

Nessas doenças agudas, as lesões tubulares poderão ser reparadas se houver membrana basal tubular intacta e/ou se existir células epiteliais viáveis em número suficiente, pois os néfrons sobreviventes poderão se hipertrofiar, compensando a redução numérica e mantendo a função renal. Partindo desse princípio, pesquisas com terapia celular para doenças renais vêm sendo empreendidas nos últimos anos e mostram-se promissoras no restabelecimento funcional do órgão (Bi et al., 2007; Chagastelles et al, 2010; Chen et al., 2011).

## 2.2 Terapia celular

As células-tronco mesenquimais (CTM) são encontradas em todos os tecidos adultos, em região perivascular, contudo, em quantidades reduzidas. (Meirelles et al., 2008; Zucconi et al., 2009). São capazes de se diferenciar *in vivo* e *in vitro* (Giordano et al., 2007) devido as características multipotente, e substituir e estimular qualquer tipo celular, tal como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras, a fim de reparar tecidos acometidos por injúrias ocasionadas ao organismo (Pittenger et al., 1999).

A medula óssea é a que constitui o principal sítio doador de células tronco mesenquimais e hematopoiéticas (Pittenger et al., 1999; Minguell et al., 2000) e é o único órgão onde duas populações de células tronco adulta não só coexistem, mas também cooperam (Bianco et al., 2001). Podem ser extraídas também de outras regiões do organismo como tecido adiposo, polpa dentária, parede do cordão umbilical, fígado, membrana sinovial, pele, líquido amniótico e placenta (Keating, 2006).

Inúmeras moléculas bioativas são liberadas pelas CTM, permitindo a interação com o meio para o qual são transplantadas e com as demais células do organismo, modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (WAN et al., 2008; Caplan, 2009), fato que torna a sua utilização para terapia promissora (Caplan, 2009).

Pesquisas preconizando terapia celular, com o objetivo de encontrar soluções para o limitado potencial de reparação renal e fornecer alternativa para tratamento vem sendo empreendidas no mundo todo. Alguns estudos têm sugerido que o transplante de CTM contribui para a reparação renal, principalmente por mecanismos parácrinos pela secreção de fatores de

crescimento na região lesionada (Kale et al, 2003; Bi et al., 2007; Togel et al., 2007; Wan et al., 2008) e auxiliam na recuperação da função renal, estimulando a angiogênese e regeneração tubular (Togel et al., 2007; Mias et al., 2008; La Manna et al., 2011).

### **3 OBJETIVO**

O presente estudo avaliou os efeitos do transplante alogênico de CTM derivadas de tecido adiposo, após lesão renal aguda secundária à isquemia da artéria renal seguida de reperfusão do fluxo renal, aplicadas por vias intrarrenal e hematogena, e em dois diferentes tempos, 24 e 48 horas pós isquemia.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Experimentação *in vitro*

#### 4.1.1 Animais de experimentação

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação com Animais, da Universidade Vila Velha (UVV), protocolado sob-registro: 109/2010.

Para a experimentação *in vitro* foram utilizados três ratos da linhagem Lewis transgênicos para proteína verde fluorescente – GFP (LEW-Tg eGFP F455/Rrrc), cujas matrizes foram provenientes da Universidade de Missouri nos Estados Unidos da América. Os três animais, machos, de 4 semanas de vida, foram obtidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e as etapas de cultura celular foram realizadas em conjunto com pesquisadores do Laboratório de imunogenética da UFMG.

#### 4.1.2 Cultura celular

Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara anestésica, com inalação passiva, até a sobredosagem de isoflurano. Foi realizada tricotomia do abdômen e membros pélvicos e em seguida os animais foram transferidos

para capela de fluxo horizontal. Foi realizada incisão abdominal na linha branca, exposição do peritônio e retirada da gordura inguinal.

Essa gordura coletada foi cortada em pequenos pedaços, lavada duas vezes em solução contendo tampão de fosfato salina (PBS) a 0,15M, acrescido de penicilina, estreptomicina e anfotericina B (PSA) (Gibco, Paisley, UK) e apresentando pH 7,2. Após a lavagem, o tecido foi armazenado em solução de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e PSA, durante 15 minutos.

Em seguida, realizou-se digestão enzimática do tecido adiposo com solução de colagenase do tipo I (Sigma, St Louis MO, USA), por 60 minutos, em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, agitado a cada 15 minutos. Posteriormente, foi realizada centrifugação a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos e o precipitado foi ressuspensionado em DMEM completo após descarte do sobrenadante.

As células foram plaqueadas inicialmente na concentração de  $5 \times 10^6$  células em frascos de cultura celular de 75 mm<sup>2</sup> (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) e mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O aumento do número de células foi acompanhado diariamente, com auxílio de microscópio invertido. Os meios de cultura foram trocados mediante a necessidade e as tripsinizações e passagens realizadas quando visualizado 80% de expansão celular nas placas, até a quarta passagem.



#### *4.1.3 Caracterização celular*

Uma alíquota das células da quarta passagem, derivadas de tecido adiposo, foi caracterizada por citometria de fluxo através da análise de expressão de moléculas de superfície celular para MHC-I, MHC-II, CD 73 (anti-CD73 clone 5 F/B9 mouse – AbCam Cambridge, Massachusetts, EUA), CD 11 (anti-CD11b– AbCam), CD 90 (anti-CD90 clone Ox-7 mouse – AbCam) e CD 45 (anti-CD45 clone 69 mouse – BD Bioscience, San Jose, Califórnia, EUA), utilizando citômetro de fluxo FACScan e software CellQuest®, obtendo-se 30.000 eventos por amostra testada.

#### *4.1.4 Diferenciação osteogênica*

Outra alíquota de células de quarta passagem foi submetida a etapas de diferenciação osteogênica. As células aderentes foram desprendidas com tripsina, contadas e replaqueadas em placa de 6 poços, com lamínulas de 22 mm de diâmetro, com meio de cultura DMEN enriquecido com 10% de SFB,  $10^{-8}$  mol/mL de dexametasona (Sigma, St Louis MO, USA), 5,0µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma, St Louis MO, USA) e 10,0mmol/L de β-glicerofosfato (Sigma, St Louis MO, USA) e incubado a 37°C por quatro semanas.

No 30º dia após a colocação das células no meio osteogênico as lamínulas foram lavadas em PBS e coradas pelo método de Von Kossa para observar a deposição de cálcio.

#### *4.1.5 Preparo das células para transplante*

Após a quarta passagem, as células foram tripsinizadas, observadas em microscopia óptica para a avaliação da viabilidade celular, submetidas a contagem em câmara de Neubauer e aliqüotadas na concentração de  $1,2 \times 10^6$  células/0,5 mL de PBS. Cada alíquota foi armazenada em seringa de 1,0 mL e transportadas para o centro cirúrgico, aguardando o momento do transplante

## **4.2 Experimentação *in vivo***

### *4.2.1 Animais da experimentação*

Foram utilizados 72 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), fêmeas, de 16 semanas de idade, pesando entre 200 a 300g, oriundos do Biotério Central do campus Nossa Senhora da Penha da UVV. Os animais foram mantidos em ambiente com controle de umidade, temperatura e fotoperíodo de 12 horas, alojados

em duplas e com acesso irrestrito a uma dieta padrão e água filtrada. Todos receberam vermífugo na dose de 0,4mg/Kg de Ivermectina 2% (Mectimax Duo Ivermectina® 2% - União Agener –São Paulo- Brasil) via oral, acrescido aos bebedouros com 300ml de água e com repetição aos 8 e 10 dias, anteriormente as etapas de cirurgia.

Os animais foram pesados individualmente, identificados com brincos de numeração na orelha esquerda e distribuídos aleatoriamente entre dez grupos experimentais. Oito grupos contendo oito indivíduos e dois grupos com 4 animais.

#### *4.2.2 Procedimentos anestésicos, cirúrgicos e tratamentos*

No pré-operatório os animais receberam como medicação pré-anestésica associação de cetamina 5% (20,0 mg/Kg), midazolam 0,5% (2,5 mg/Kg) e morfina 1% (1,0 mg/Kg), administrados pela via intramuscular (IM). Após a perda do reflexo de endireitamento (15 minutos após a MPA) foi realizada tricotomia de toda região abdominal do paciente, seguindo para a etapa de indução e manutenção anestésica com isoflurano 2,0% diluído em 100% de oxigênio, via máscara facial acoplada a um circuito sem reinalação. O plano anestésico foi ajustado de acordo com a ausência de movimentos e com a perda do reflexo de pinçamento da cauda e dos dígitos, além da avaliação clínica dos parâmetros relacionados à frequência cardíaca, frequência respiratória (FC e FR) e temperatura retal (TR). Os animais receberam antibioticoterapia profilática com enrofloxacin (10,0 mg/kg) por via subcutânea (SC).

Foi realizada antisepsia da região abdominal utilizando álcool 70% e iodopovidona (PVPI) tópico 10%, o campo cirúrgico foi posicionado e os animais foram submetidos à celiotomia pré-umbilical paramediana, com 2,0 cm de extensão. Em seguida, foi utilizado afastador auto-estático (blefarostato) para manter a exposição da cavidade, o rim esquerdo foi localizado e os vasos reanais identificados, realizando a obstrução da artéria e veia renais durante 24 horas, utilizando clipe vascular (figura 1).



**Figura 2-** Clipes vascular utilizados durante a celiotomia pré-umbilical paramediana dos ratos, para promover a obstrução do fluxo sanguíneo das artéria e veia renais. (escala = 1 cm).

Posteriormente, realizou-se a refia dos músculos oblíquos e pele com fio não-absorvível sintético (nylon 3-0) e pontos cruzados e tipo Wolf, respectivamente. Em acréscimo, sobre a sutura de pele, aplicou-se cola cirúrgica (cianoacrílica). Nos animais que apresentaram perda sanguínea durante o transcirúrgico, foi instituído a aplicação intraperitoneal de até 3,0 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%, antes da realização das suturas.

Após o período de 24 horas, os animais foram novamente submetidos à celiotomia pré-umbilical paramediana e o clipe vascular foi removido. No pós-operatório os animais receberam Sulfato de Morfina (Dimorf® - São Paulo – Brasil) na dose de 0,6mg/Kg por via intramuscular (IM), a cada 8 horas, durante 3 dias.

Os animais alocados no grupo Sham foram submetidos aos mesmos procedimentos anestésico e cirúrgico sem, contudo, haver a clipagem da

artéria e veia renal. Os animais do grupo 10 não receberam nenhum tipo de tratamento. Os demais grupos foram tratados após as 24 ou 48 horas de reperfusão, de acordo com as denominações abaixo:

**Grupo 1-** Tampão Fosfato Salina (PBS): oito animais tratados com 0,5 mL de PBS, administrados na veia lateral da cauda, 24 horas após a reperfusão;

**Grupo 2-** PBS: oito animais tratados com 0,5 mL de PBS, administrados intrarrenal, 24 horas após a reperfusão;

**Grupo 3-** Células tronco mesenquimais (CTM): oito animais tratados com *pellet* celular contendo  $1,2 \times 10^6$  células/0,5 mL de PBS, administrados na veia lateral da cauda, 24 horas após a reperfusão;

**Grupo 4-** CTM: oito animais tratados com *pellet* celular contendo  $1,2 \times 10^6$  células/0,5 mL de PBS, administrados intrarrenal, 24 horas após a reperfusão;

**Grupo 5-** PBS: oito animais tratados com 0,5 mL de PBS, administrados na veia lateral da cauda, 48 horas após a reperfusão.

**Grupo 6-** PBS: oito animais tratados com 0,5 mL de PBS administrados intrarrenal, 48 horas após a reperfusão;

**Grupo 7-** CTM: oito animais tratados com *pellet* celular contendo  $1,2 \times 10^6$  células/0,5 mL de PBS, administrados na veia lateral da cauda, 48 horas após a reperfusão.

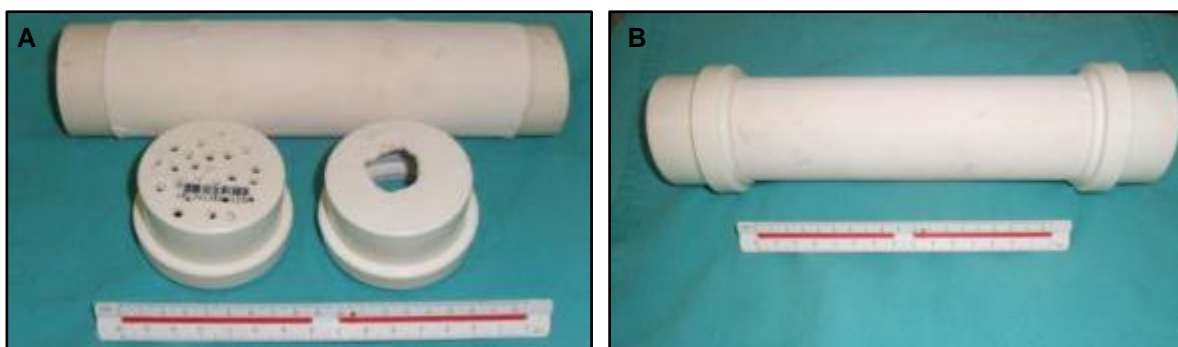
**Grupo 8-** CTM: oito animais tratados com *pellet* celular contendo  $1,2 \times 10^6$  células/0,5 mL de PBS, administrados intrarrenal, 48 horas após a reperfusão.

**Grupo 9-** Sham: quatro animais foram submetidos apenas aos procedimentos anestésicos seguido de celiotomia paramediana, manipulação renal e rafia dos planos cirúrgicos.

**Grupo 10** – Controle histológico: quatro animais submetidos aos procedimentos anestésicos e cirúrgicos, incluindo as etapas de obstrução e reperfusão sanguínea, sem a realização de tratamento.

Ao término dos procedimentos cirúrgicos e após o retorno anestésico dos pacientes, os ratos retornaram para o biotério e foram acompanhados diariamente, quanto ao comportamento dos animais em relação à ingestão de alimento e água, movimentação no interior da caixa-alojamento e temperatura corporal, durante 31 dias.

Para a realização dos tratamentos, os animais dos grupos 1, 3, 5 e 7 foram contidos em um cano de policloreto de vinila (PVC) de 7,0 cm de diâmetro e 20 cm de extensão, com tampas perfuradas em ambas extremidades para facilitar a entrada de ar e a contenção da cauda do animal (figura 2). Nos grupos 2, 4, 6 e 8 os ratos foram contidos manualmente, com auxílio de uma compressa, apoiando-os sobre a mesa, com imobilização do dorso, permitindo a realização do exame ultrassonográfico e com Doppler colorido.



**Figura 2-** A e B) Cano de policloreto de vinila (PVC) de 7,0 cm de diâmetro e 20,0 cm de extensão, com tampas perfuradas em ambas extremidades para facilitar a entrada de ar e a contenção da cauda do animal.

#### *4.2.3 Avaliações ultrassonográfica bidimensional e com Doppler colorido*

Em 16 animais, escolhidos aleatoriamente, foram realizados exames ultrassonográficos bidimensionais e com Doppler colorido, aos 7 dias antes do

procedimento cirúrgico, para verificação dos padrões de normalidade do órgão estrutural e hemodinâmica, utilizando o aparelho de ultrassom GE Logiq-E, com transdutor setorial 8C (4 - 11 MHz). Nesses animais, o Doppler colorido também foi realizado após a colocação e a remoção do clipe vascular, permitindo a avaliação da isquemia e reperfusão renal. Em todos os animais dos grupos 2, 4, 6 e 8, a US bidimensional foi utilizada para possibilitar a aplicação percutânea dos tratamentos intrarrenal.

#### *4.2.4 Mensurações de Ureia e Creatinina*

Para a mensuração dos valores sanguíneos de ureia e creatinina o sangue foi coletado por meio de venopunção femoral, com auxílio de um cateter 24 gauge(G) e capilares heparinizados. Depois de cada coleta, foi realizado tratamento tópico no local da punção, utilizando uma pomada a base de polissulfato de mucopolissacarídeo e propilenoglicol (Hirudoid<sup>®</sup> 40g – Sankyo-São Paulo- Brasil).

As coletas foram realizadas 7 dias antes do ato cirúrgico (controle), 24 horas após a reperfusão e aos 8, 15 e 31 dias pós-tratamento. Todas as comparações foram realizadas dentro do próprio grupo, em relação ao valor controle.

#### 4.2.5 Procedimentos histológicos

Vinte e quatro horas após a obstrução da artéria e veia renais, os quatro animais do grupo 10 foram submetidos a nefrectomia do rim esquerdo, no momento da retirada dos cliques vasculares. Para os demais grupos, a nefrectomia do rim esquerdo foi realizada em quatro animais aos 8 e no restante dos animais aos 31 dias pós-tratamento. O rim coletado foi seccionado sagitalmente, fotografado por câmera digital (Sony, modelo Cyber-Shot 10.1), colocados em cassetes plásticos e imersos em paraformaldeído tamponado 4%, durante 24 horas para fixação.

Em seguida, o material foi enviado para o Laboratório de Anatomia Patológica e Histopatológica do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Vila Velha, submetido a processamento histológico rotineiro, incluído em parafina, cortados sagitalmente em micrótomo em secções semi-seriadas de 5,0µm para confecção das lâminas histológicas e coradas por hematoxilina e eosina (HE).

As lâminas contendo os cortes sagitais centrais foram analisadas em microscópio ótico para determinação do grau de lesão e necrose renal. Conforme preconizado por Melnikov et al. (2002), de maneira cega sem conhecimento do grupo avaliado, uma lamínula gradeada milimetricamente foi posicionada sobre o corte histológico do tecido, e 20 áreas pre-determinadas, envolvendo toda a extensão tecidual, foram estudadas. A extensão da área de necrose tubular, formação de cilindros e dilatação tubular foi pontuada e classificada em: 0 (nenhum), 1 ( $\leq 10\%$ ), 2 (11-25%), 3 (26-45%), 4 (46-75%), e 5 ( $\geq 76\%$ ).

As lâminas também foram analisadas em microscópio de fluorescência direta (Fluor Cell Imager Station – Life Technologies), sob luz ultravioleta e filtros a



laser alcançando comprimentos de ondas para as cores verde e azul, na tentativa de se visualizar células com expressão da proteína GFP.

#### 4.2.6 Avaliação estatística

A tabulação dos dados e avaliação estatística foi realizada com auxílio de planilhas eletrônicas do Excel<sup>®</sup> e do software Graphpad Prism<sup>®</sup>. Os valores mensurados de ureia e creatinina foram comparados entre os tempos de avaliação, dentro dos diferentes tipos de tratamento. Os valores dessas variáveis foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da distribuição de normalidade, seguidos de ANOVA (análise de variância) e *post-test* de comparação múltipla utilizando Tukey.

Para as variáveis obtidas pela análise histológica: extensão da área de necrose tubular, formação de cilindros, perda da borda em escova e dilatação tubular os valores obtidos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da distribuição de normalidade, seguido do teste de Kruskal-Wallis e *post-test* de comparação múltipla utilizando Dunn. Para todos os dados estatísticos obtidos foi adotado um nível de rejeição da hipótese de nulidade de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

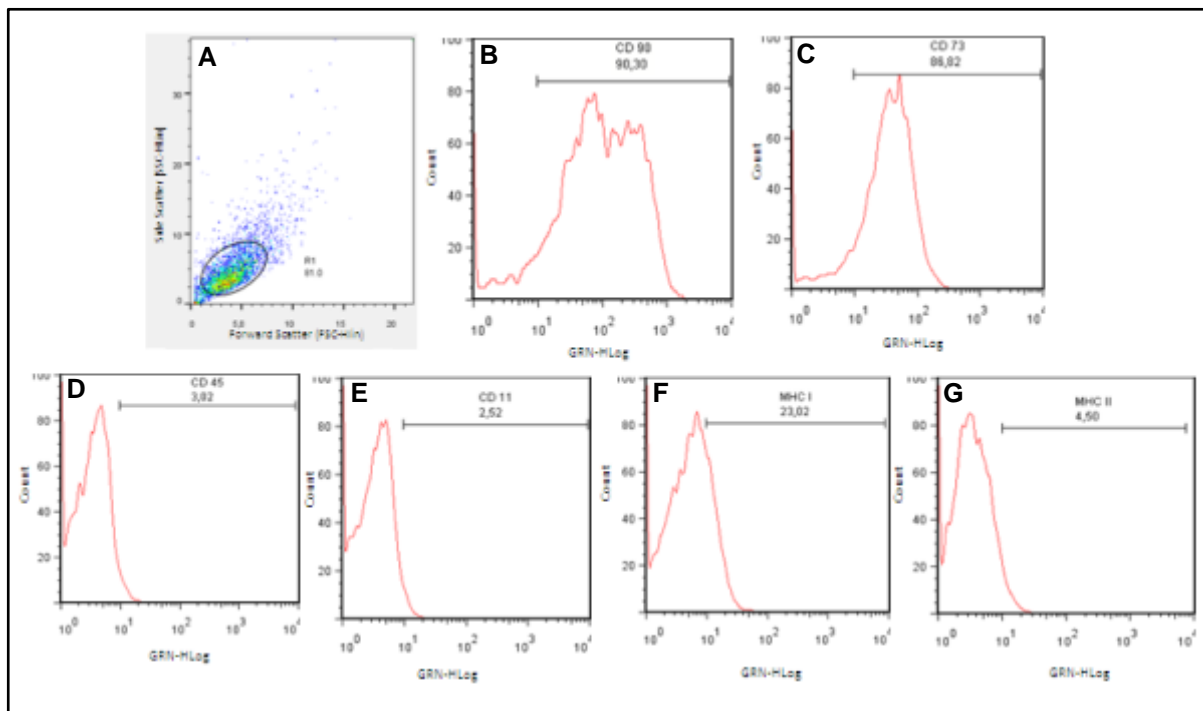
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Cultura celular

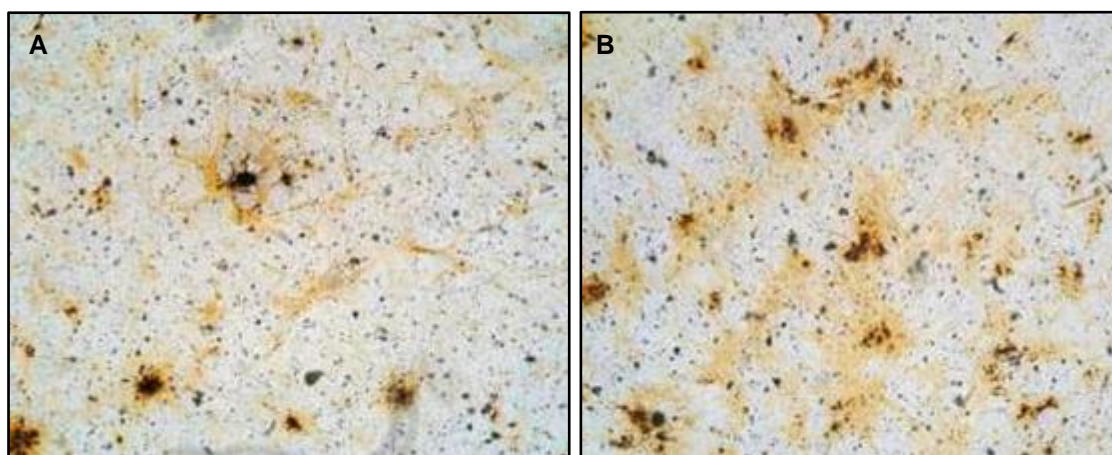
O tecido adiposo foi capaz de propiciar uma cultura heterogênea, composta por células arredondadas, não aderentes e micelas lipídicas no sobrenadante da cultura nas primeiras 24 horas. A partir do oitavo dia, a população celular apresentava-se mais homogênea, com predominância das células aderentes de morfologia fibroblastóide, organizadas em colônias.

A citometria de fluxo realizada com uma amostra de cultura de quarta passagem de células e GFP demonstrou que cerca de 90,30% das células expressaram CD90, 86,82% CD73, e, aproximadamente, 3,02% expressaram CD45, 2,52% CD11, 23,02% MHC-I e 4,50% MHC-II (figura 3). O conjunto de marcadores utilizados permitiu inferir que a população celular isolada e cultivada era homogênea, claramente distinta da linhagem hematopoiética e com baixa expressão de moléculas de histocompatibilidade.

A cultura de células submetidas à diferenciação osteogênica apresentou pontos de calcificação da matriz a partir do décimo dia após indução da diferenciação e as células diferenciadas mudaram da aparência fibroblastóide, alongada, para uma forma mais arredondada. Evidenciou-se a presença da matriz extracelular rica em cálcio devido à observação de nódulos de mineralização amarronzados ou negros na coloração de Von Kossa, aos 30<sup>o</sup> dia, comprovando a diferenciação em osteoblastos das MSC cultivadas (figura 4).



**Figura 3** - Avaliação fenotípica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratos Lewis eGFP, por citometria de fluxo. A) Gráfico de granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC) demonstrando a população celular selecionada para estudo (R1). B a G) Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro da população selecionada (R1), com os anticorpos anti-CD90, anti-CD73, anti-CD45, anti-CD11, anti-MHC I e anti-MHC-II, respectivamente.



**Figura 4** - Cultura de células submetidas à diferenciação osteogênica A e B) Pontos de calcificação da matriz e células diferenciadas com aparência mais arredondada. Nódulos de mineralização amarronzados ou enegrecidos na coloração de Von Kossa, aos 30<sup>o</sup> dia, comprovando a diferenciação em osteoblastos das CTM cultivadas.

## 5.2 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

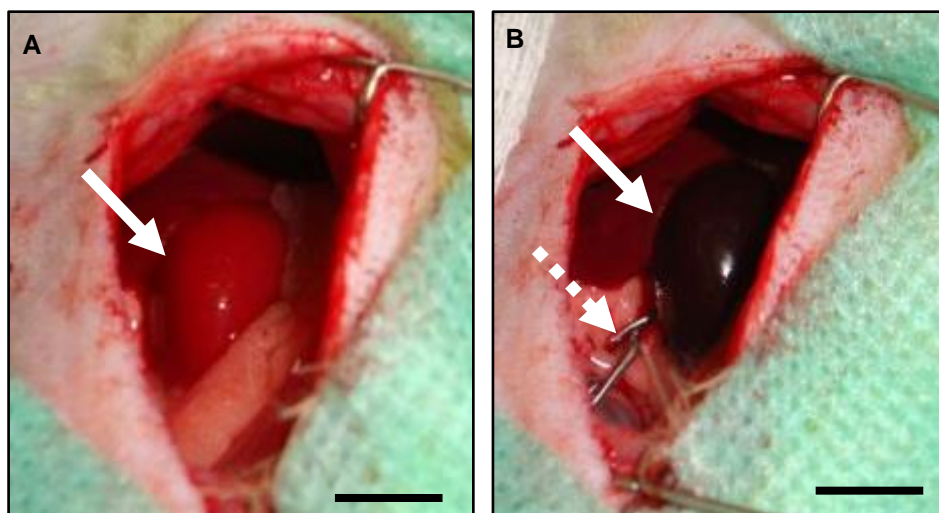
Os fármacos utilizados durante os procedimentos anestésicos foram eficazes, mantendo o animal em plano anestésico adequado. Observou-se diminuição dos reflexos de pinçamento da cauda e dos dígitos 15 minutos após a MPA e perda desses reflexos após a indução anestésica, mantendo-se ausente durante todo o transcirúrgico. Os parâmetros vitais, como frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corporal que se mantiveram próximo dos valores de normalidade para a espécie e não sofreram grandes variações durante a manipulação cirúrgica.

O acesso cirúrgico pré-umbilical, paramediano no antimerro esquerdo permitiu a localização do órgão e exploração anatômica dos vasos renais sem a necessidade de grande manipulação sobre o rim evitando danos ao parênquima.

O clipe vascular utilizado para promover isquemia foi eficaz na obstrução do fluxo sanguíneo para o órgão. Visualizou-se macroscopicamente, durante a isquemia, a mudança da coloração do parênquima renal de vermelho brilhante para vermelho escurecido, e após a remoção do clipe, esta coloração retornava para o vermelho inicial (figura 5).

A reposição volêmica não foi necessária em nenhum paciente e os pontos de sutura foram adequados para rafia dos planos. O uso da cola cirúrgica na pele foi realizado por precaução, para evitar a automutilação.

Os tratamentos foram realizados de acordo com o preconizado na metodologia e sem intercorrências.



**Figura 5-** Celiotomia pré-umbilical paramediana em rato. **A)** Evidência para coloração vermelho brilhante do parenquima renal (seta), exibido anteriormente à obstrução dos vasos renais. **B).** Evidência para coloração vermelho escurecido do parenquimal renal (seta), exibido posteriormente à obstrução dos vasos renais com o clipe vascular (seta tracejada) (escala = 1,0cm)

### 5.3 Avaliações clínicas

Na inspeção clínica, realizada nos três primeiros dias de pós-cirúrgico, observou-se que o comportamento dos animais quanto à ingestão de alimento e água e a movimentação no interior da caixa-alojamento apresentava-se semelhante a ratos não operados, permitindo constatar que o uso do opioide foi eficiente para o controle da dor em todos os animais.

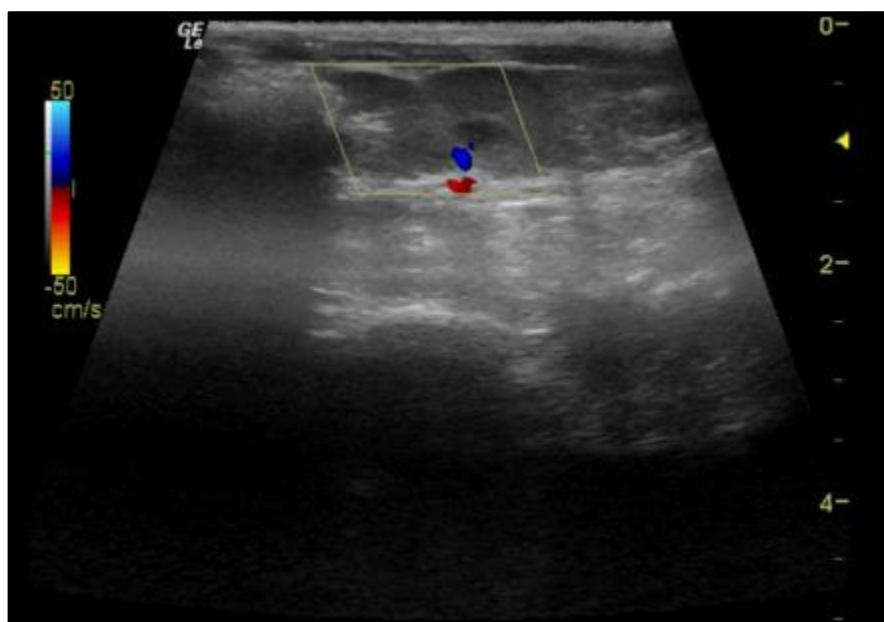
Não foi observada deiscência de sutura em nenhum paciente e nem hipertermia.

#### 5.4 Avaliações ultrassonografia bidimensional e com Doppler colorido

A avaliação ultrassonográfica bidimensional e com Doppler colorido foi um método eficaz para visualização do órgão e do fluxo sanguíneo e prático para a realização do tratamento

A direção do fluxo, em relação ao transdutor, apresentou coloração vermelha e, na direção contrária, coloração azul, fato observado nos 16 animais, escolhidos aleatoriamente para verificação dos padrões de normalidade do fluxo renal e nos animais dos grupos 2, 4, 6 e 8 após remoção do clipe vascular, comprovando o fluxo sanguíneo no órgão.

A ausência das colorações vermelha e azul, na avaliação com Doppler colorido, na presença do clipe vascular sobre a artéria renal, nos grupos 2, 4, 6 e 8 nos revelou a total oclusão de fluxo sanguíneo para o órgão.



**Figura 6-** Mapeamento com Doppler colorido da região hilar renal, demonstrando a hemodinâmica nessa região. A direção do fluxo, em relação ao transdutor, apresentou coloração vermelha e, na direção contrária, coloração azul.

## 5.5 Mensurações de ureia e creatinina

As mensurações basais de ureia e creatinina, em valores medianos, avaliadas antes dos animais serem submetidos ao ensaio clínico, apresentaram valores médios de  $37,1 \pm 4,7$  mg/dl e de  $0,62 \pm 0,11$  mg/dl, respectivamente. Os demais valores estão apresentados nas tabelas 1 e 2.

Após a realização da obstrução renal e isquemia por 24 horas a dosagem de creatinina, apresentou uma tendência ao aumento, não diferindo estatisticamente entre os períodos ou entre os grupos. Na mensuração de ureia sérica os grupos experimentais 1 e 5 apresentaram aumento nos valores e diferiram estatisticamente dos demais grupos.

Após 8 e 15 dias da reperfusão sanguínea, os níveis de ureia e creatinina aumentaram em relação aos valores controle, com diferença estatística entre todos os grupos.

Após 31 dias os níveis de creatinina dos animais do grupo 2, 3, 4, 5, 6 e 8 tenderam a normalidade (controle) enquanto para os valores de ureia, apenas os animais dos grupos 4 e 7 obtiveram comportamento similar.

**Tabela 1** – Valores médios mensurados de creatinina em ratos Wistar, dos grupos experimentais, nos diferentes tempos de avaliações

Grupo	Controle	24 Horas	8 Dias	15 dias	31 Dias	p
1 Grupo	0,52±0,11 <sup>ab</sup>	0,29±0,02 <sup>a</sup>	1,10±0,33 <sup>c</sup>	0,84±0,33 <sup>bc</sup>	0,78±0,11 <sup>bc</sup>	< 0,0001
2 Grupo	0,62±0,01 <sup>a</sup>	0,7±0,01 <sup>ab</sup>	1,02±0,42 <sup>b</sup>	0,73±0,10 <sup>ab</sup>	0,75±0,12 <sup>ab</sup>	0,0266
3 Grupo	0,62±0,01 <sup>a</sup>	0,91±0,27 <sup>a</sup>	1,95±1,26 <sup>b</sup>	0,80±0,01 <sup>a</sup>	0,88±0,29 <sup>a</sup>	0,0019
4 Grupo	0,83 ±0,33 <sup>a</sup>	1,05 ±0,56 <sup>a</sup>	1,25 ±0,24 <sup>a</sup>	0,82 ±0,09 <sup>a</sup>	0,81 ±0,01 <sup>a</sup>	0,0525
5 Grupo	0,54 ±0,17 <sup>a</sup>	0,68 ±0,16 <sup>ab</sup>	1,16±0,41 <sup>b</sup>	0,79±0,01 <sup>a</sup>	0,83±0,07 <sup>ab</sup>	< 0,0001
6 Grupo	0,66±0,04 <sup>a</sup>	0,77 ±0,22 <sup>ac</sup>	1,52 ±0,16 <sup>d</sup>	1,05 ±0,04 <sup>bc</sup>	0,83±0,05 <sup>ac</sup>	< 0,0001
7 Grupo	0,59±0,16 <sup>a</sup>	0,70±0,11 <sup>ac</sup>	1,41±0,14 <sup>d</sup>	0,86±0,12 <sup>bc</sup>	0,85±0,08 <sup>bc</sup>	< 0,0001
8 Grupo	0,57±0,10 <sup>a</sup>	0,74±0,26 <sup>a</sup>	1,43±2,25 <sup>b</sup>	0,69±0,16 <sup>a</sup>	0,78±0,08 <sup>a</sup>	< 0,0001

\*Médias com letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

**Tabela 2** – Valores médios mensurados de ureia em ratos Wistar, dos grupos experimentais, nos diferentes tempos de avaliações

Grupo	Controle	24 Horas	8 Dias	15 dias	31 Dias	p
1 Grupo	31,48 <sup>a</sup> ±1,62	47,67 <sup>b</sup> ±4,13	54,71 <sup>b</sup> ±1,37	54,27 <sup>b</sup> ±4,04	54,86 <sup>b</sup> ±15,06	< 0,0001
2 Grupo	36,8 <sup>a</sup> ±0,01	47,25 <sup>ac</sup> ±0,01	57,47 <sup>bc</sup> ±5,44	58,28 <sup>a</sup> ±15,25	60,41 <sup>bc</sup> ±11,84	0,0004
3 Grupo	36,8 <sup>a</sup> ±0,01	43,74 <sup>ac</sup> ±13,00	68,21 <sup>b</sup> ±12,90	55,80 <sup>bc</sup> ±0,01	55,26 <sup>bc</sup> ±11,46	< 0,0001
4 Grupo	46,68 <sup>a</sup> ±6,17	46,15 <sup>a</sup> ±17,38	51,77 <sup>a</sup> ±4,19	54,73 <sup>a</sup> ±11,65	53,10 <sup>a</sup> ±0,34	0,4738
5 Grupo	34,42 <sup>a</sup> ±9,05	50,93 <sup>b</sup> ±6,03	55,47 <sup>b</sup> ±4,16	60,85 <sup>b</sup> ±5,59	63,16 <sup>b</sup> ±13,63	< 0,0001
6 Grupo	38,03 <sup>a</sup> ±3,85	40,93 <sup>a</sup> ±5,18	50,75 <sup>ac</sup> ±4,78	61,23 <sup>bc</sup> ±12,61	59,64 <sup>bc</sup> ±9,61	< 0,0001
7 Grupo	37,50 <sup>a</sup> ±5,35	50,32 <sup>ac</sup> ±3,78	58,83 <sup>bc</sup> ±18,27	53,28 <sup>ac</sup> ±6,98	45,84 <sup>ac</sup> ±9,17	0,0149
8 Grupo	35,19 <sup>a</sup> ±11,60	51,09 <sup>ab</sup> ±7,83	55,95 <sup>b</sup> ±19,38	53,85 <sup>b</sup> ±6,11	51,76 <sup>b</sup> ±5,34	0,0063

\*Medias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

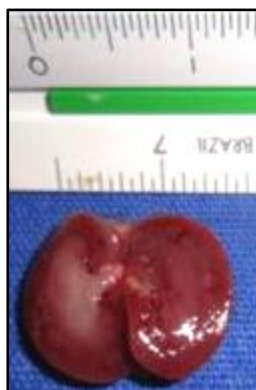


## 5.6 Avaliação histopatológica

### 5.6.1 – Aspecto macroscópico após nefrectomia

Após nefrectomia o rim foi seccionado sagitalmente, fotografado, alocados em cassetes e fixados em paraformaldeído 4%, permanecendo por 24 horas.

Na avaliação macroscópica renal após a nefrectomia, o grupo Sham, aos 8 e 31 dias, apresentou coloração vermelha brilhante do parênquima renal, semelhante ao rim normal, com preservação das regiões de cortical e medular e tamanho semelhante ao rim contralateral (figura 7).

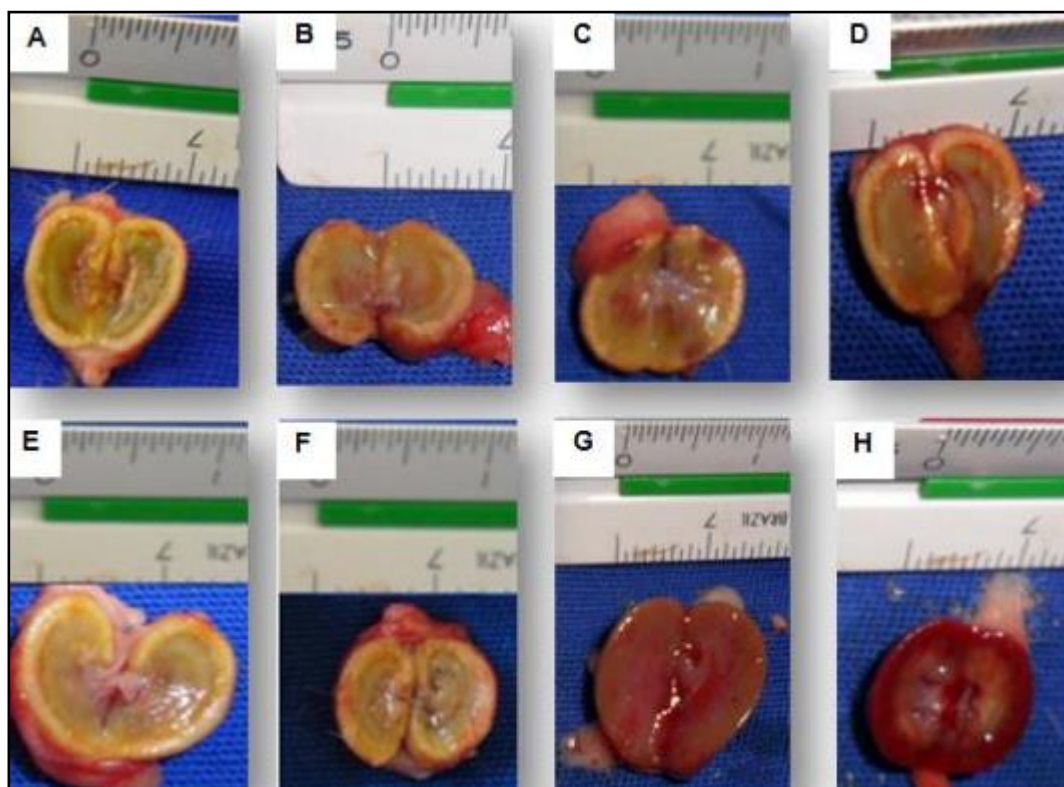


**Figura 7** – Aspecto macroscópico renal de ratos Wistars, do grupo sham, exibindo coloração vermelha brilhante do parênquima renal, semelhante ao rim normal, com preservação das regiões de cortical e medular.

No grupo 10, na avaliação realizada 24 horas após a isquemia, visualizou-se no rim isquemiado uma coloração vermelha escura, de aparência congesta, tamanho similar ao rim contralateral e discreta delimitação da região cortical e medular.

Aos 8 dias, observou-se uma coloração pálida difusa em região cortical e medular, nos grupos tratados com PBS (grupos 1, 2, 5 e 6), em ambos os períodos. Nos grupos 1 e 2 não foi possível diferenciar a região cortical da medular e os rins apresentavam discreto aumento de tamanho, comparado com um rim normal da espécie. Nos grupos tratados com CTM em 24 horas (3 e 4) os rins apresentaram áreas avermelhadas focais, na cortical e medular, sem delimitação dessas regiões e com espessamento de cortical. Nos grupos 7 e 8 (48 horas), os rins apresentaram tamanho normal e coloração do parênquima vermelho brilhante difusa, com áreas focais de coloração vermelho escuro na região medular.

Aos 31 dias, nos grupos 1, 2, 5 e 6 existia uma palidez difusa em parênquima, acentuada em região de cortical, que também se apresentava adelgada comparando-se com um rim normal, e permitiu a delimitação das regiões renais (figura 8A, 8B, 8E e 8F). Nos grupos 3 e 4 os rins apresentam tamanhos normais e áreas focais com coloração avermelhadas, em maior extensão quando comparada com a avaliação anterior (8 dias) e com delimitação de cortical e medular mais evidente (figura 8C e 8D). No grupo 7 foi visualizada coloração vermelha difusa, mais evidente na região medular e com discreta diferenciação com a região cortical (figura 8G). No grupo 8 foi identificadas colorações vermelha brilhante na região cortical, próxima ao normal em toda área e coloração menos intensa na região medular, com retração de pelve renal (figura 8H).

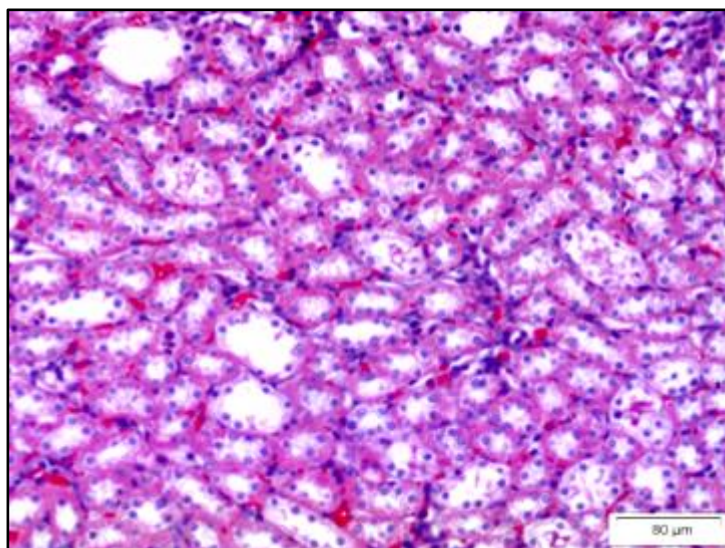


**Figura 8** – Fotos demonstrativas do aspecto macroscópico do rim esquerdo de ratos Wistars submetidos obstrução da artéria e veia renais, aos 31 dias de avaliação pós-tratamento. A) Grupo 1, áreas focais com coloração avermelhadas B) Grupo 2, coloração pálida difusa em parênquima, acentuada em região de cortical. C) Grupo 3, áreas focais com coloração avermelhadas. D) Grupo 4, áreas focais com coloração avermelhadas. E) Grupo 5, coloração pálida difusa em parênquima, acentuada em região de cortical. F) Grupo 6, coloração pálida difusa em parênquima, acentuada em região de cortical. G) Grupo 7, coloração vermelha difusa, mais evidente na região medular e com discreta diferenciação com a região cortical. H) Grupo 8, coloração vermelha brilhante em região cortical e coloração menos intensa em região medular, com retração de pelve renal

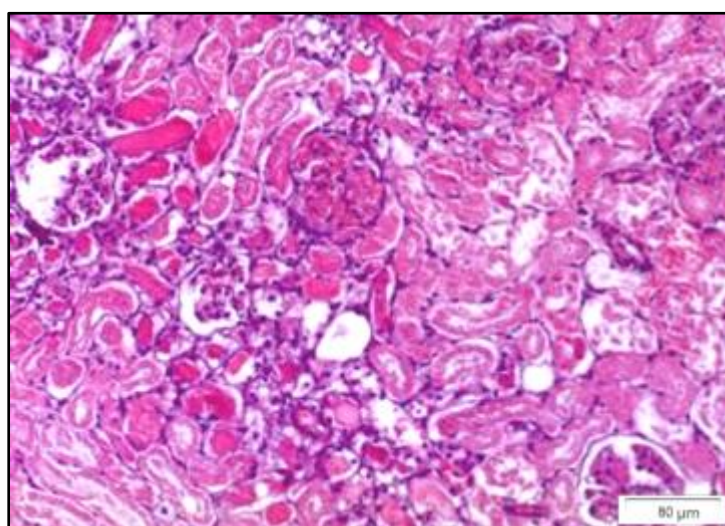
### 5.6.2 Aspecto microscópico após nefrectomia

Na avaliação histológica das lâminas do grupo Sham foi observado arquitetura dos túbulos renais preservada, não sendo evidenciadas áreas de necrose, dilatação tubular e cilindros hialinos (figura 9).

Na avaliação realizada após 24 horas de isquemia, grupo 10, notou se debris celulares no interior dos túbulos, células tubulares anucleadas, arquitetura tecidual não reservada com túbulos e glomérulos disformes, correspondendo à necrose de 5% da área, dilatação tubular de 70% e formação de cilindros hialinos em 50% dos túbulos (figura 10)



**Figura 9** – Fotomicrografia representando animal do grupo Sham. Presença de túbulos renais de arquitetura preservada e uniforme e células tubulares nucleadas (HE).



**Figura 10** – Fotomicrografia representando animal do grupo 10. Presença de dilatação tubular, com acúmulo de cilindros hialinos, arquitetura tecidual preservada com túbulos e glomérulos disformes (HE).

Aos **8 dias**, em todas as lâminas dos diferentes grupos experimentais, foram observados nos 20 campos estudados, túbulos renais desprovidos de epitélio, repletos por debris celulares, reatividade das células intersticiais correspondendo à necrose de coagulação. Essa necrose foi mais evidente nos grupos tratados com PBS, representando aproximadamente 90% no grupo 1, 80% no grupo 2, 80% no grupo 5 e 90% no grupo 6. Nos grupos tratados com CTM foi evidenciada menor área de necrose, correspondendo a 45 % no grupo 3, 25% no grupo 4, 10% no grupo 7 e 40% no grupo 8.

Em relação à dilatação tubular, identificou-se valores maiores nos grupos tratados com PBS, representando 30% no grupo 1, 45% no grupo 2, 50% no grupo 5 e 70% no grupo 6. Nos grupos tratados com CTM, a quantidade de túbulos dilatados foi menor, representando 20 % no grupo 3, 40% no grupo 4, 10% no grupo 7 e 50% no grupo 8.

A presença de cilindros hialinos no interior dos túbulos representaram nos grupos tratados com PBS 20% para grupo1, 35% para grupo 2, 50% para o grupo 5 e 10% no grupo 6. Nos grupos tratados com CTM estes valores foram de 20 % no grupo 3, 30% no grupo 4, 10% no grupo 7 e 10% no grupo 8.

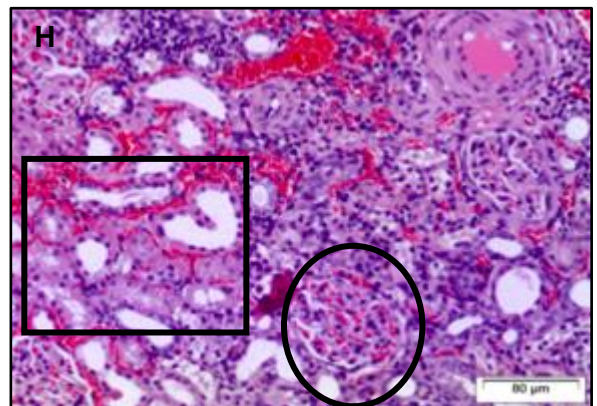
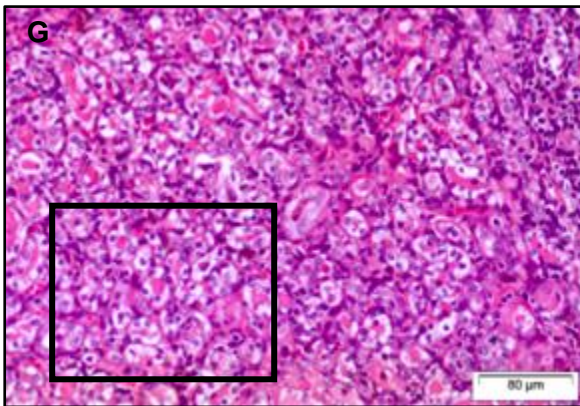
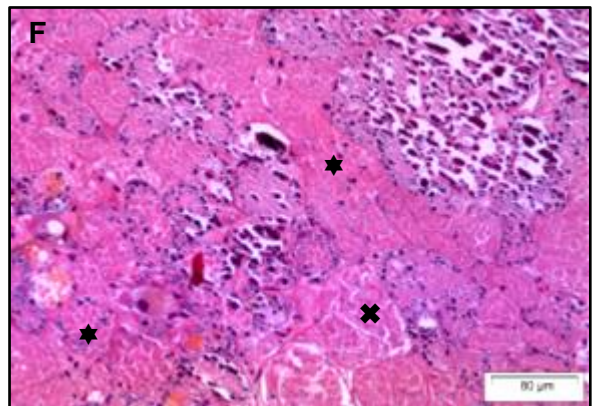
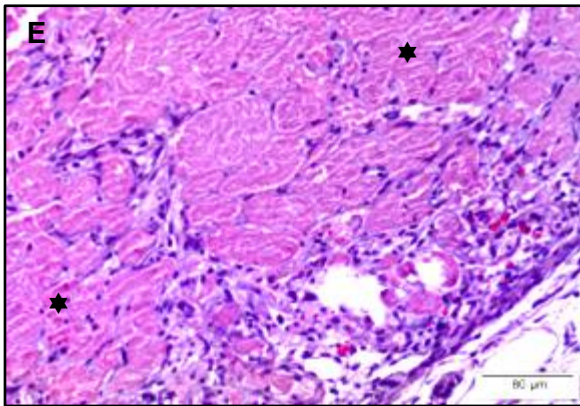
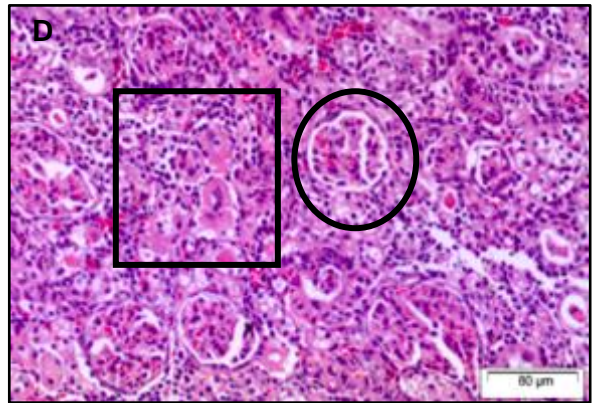
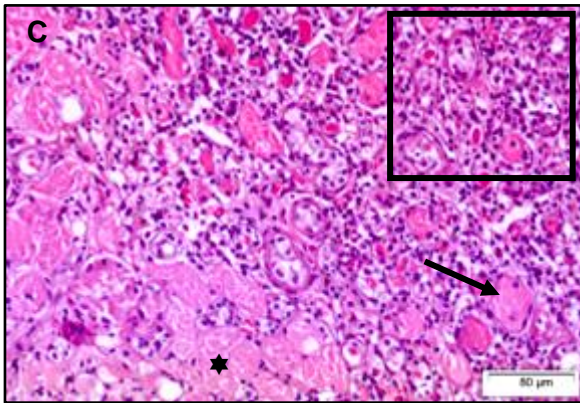
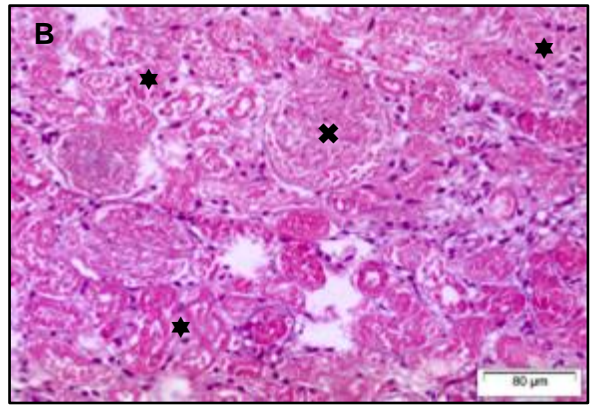
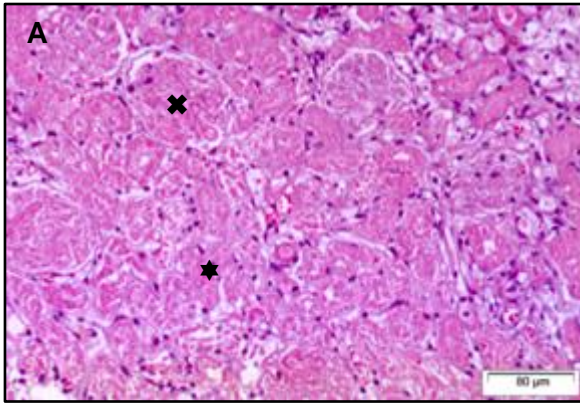
**Aos 31 dias**, os grupos tratados com PBS apresentaram necrose tubular e glomerular evidente, representando aproximadamente 90% nos grupos 1 e 2, , 100% nos grupos 5 e 6. Nos grupos tratados com CTM a necrose foi representada por menores áreas, sendo 50 % no grupo 3, 40% no grupo 4, 30% no grupo 7 e 1% no grupo 8 (figura 11).

No grupo 8 visualizaram-se áreas em franco processo de regeneração com figuras de mitoses das células tubulares e epiteliais renais, aumento do número de células intersticiais indiferenciadas e aumento do número de capilares. Constatou-se que as regiões anteriormente ocupadas por tecido necrótico foram repovoadas por novas células renais.

Em relação à dilatação tubular, nos grupos transplantados com PBS representaram 50% no grupo1, 90% no grupo 2, 50% no grupo5 e 90% no grupo 6, já nos grupos tratados com CTM estes valores foram de 50 % no

grupo 3, 30% no grupo 4, 40% no grupo 7 e 45% no grupo 8, considerando que os túbulos encontraram-se dilatados, mas, exibindo menor circunferência nos grupos transplantados com CTM.

Ainda os 31 dias, presença de cilindros hialinos apresentou valores de 10% nos grupos 1, 2 e 5 e de 1% no grupo 6. Nos grupos tratados com CTM estes valores foram de 40 % no grupo 3, 20% no grupo 4, 1% nos grupos 7 e 8.



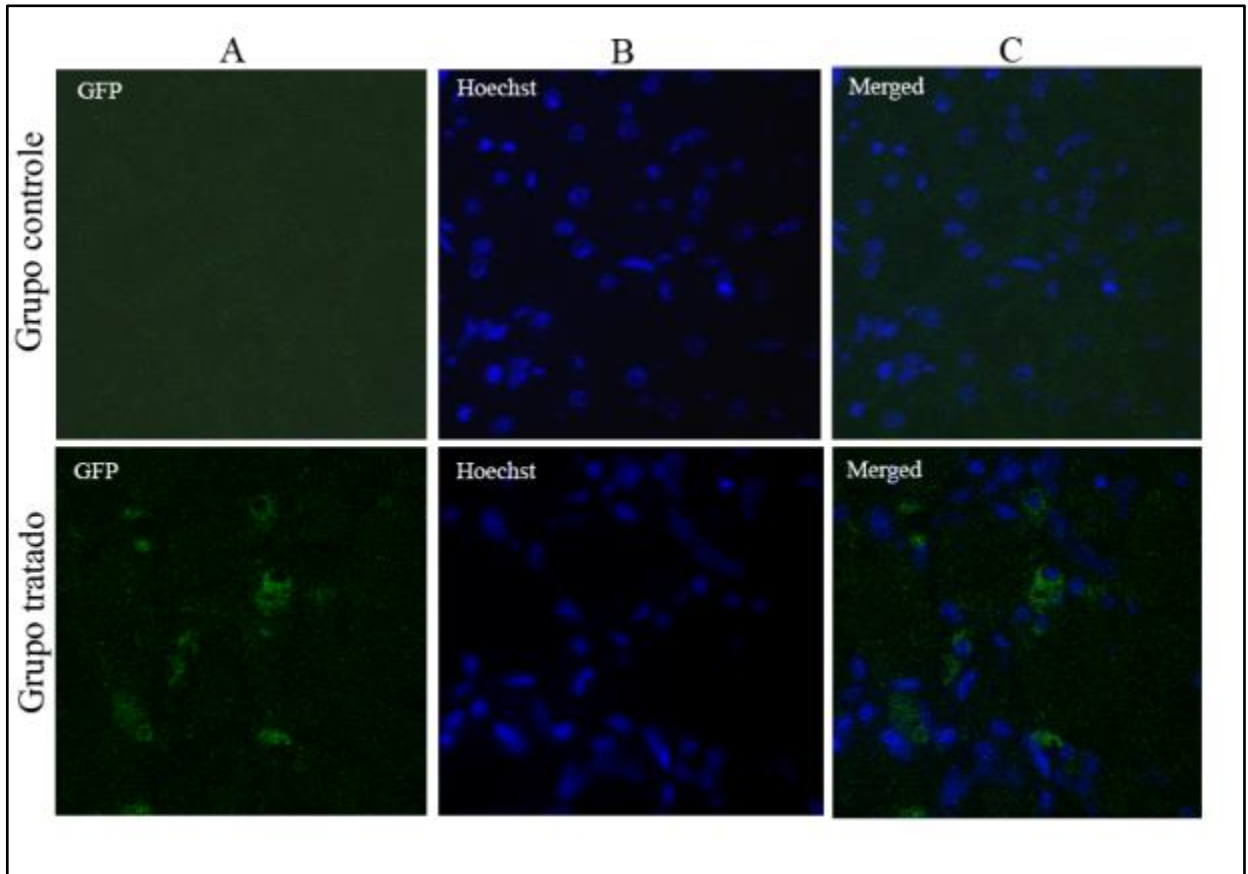
**Figura 11-** Fotomicrografia renal demonstrando aspectos histológicos dos diferentes grupos experimentais, aos 31 dias. A) Fotomicrografia representando animal do grupo 1. B) Fotomicrografia representando animal do grupo 2. Em A e B as imagens demonstram túbulos renais desprovidos de epitélio e repletos por debris celulares, necrose tubular (★) e glomerular (✱) evidente e reatividade das células intersticiais. C) Fotomicrografia representando animal do grupo 3. Áreas de necrose a esquerda do campo, túbulos nucleados (quadrado) e com arquitetura uniforme, presença de dilatação tubular (seta) e formação de cilindros hialinos. D) Fotomicrografia representando animal do grupo 4 - Túbulos renais nucleados, organização glomerular (círculo) e arquitetura preservada. E) Fotomicrografia representando animal do grupo 5. F) Fotomicrografia representando animal do grupo 6. Em E e F as imagens demonstram necrose tubular e glomerular evidente em todo campo, sem a preservação da arquitetura do parênquima. G) Fotomicrografia representando animal do grupo 7. Preservação da arquitetura estrutural do parênquima, com túbulos uniformes nucleados. H) Fotomicrografia representando animal do grupo 8. Evidenciação de vascularização, aumento de basofilia tecidual e do número de células intersticiais indiferenciadas. Preservação da arquitetura estrutural do parênquima. (HE)

Na imunofluorescência foram observadas pequenas quantidades de células com emissão de luz verde nos cortes histológicos dos grupos tratados com CTM, (figura 12).

### 5.7 Avaliação estatística

A análise estatística das variáveis necrose, dilatação tubular e presença de cilindros hialinos demonstrou haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com CTM, em 8 e/ou 31 dias, para os grupos nos quais foram tratados com PBS, independentemente da via de aplicação.





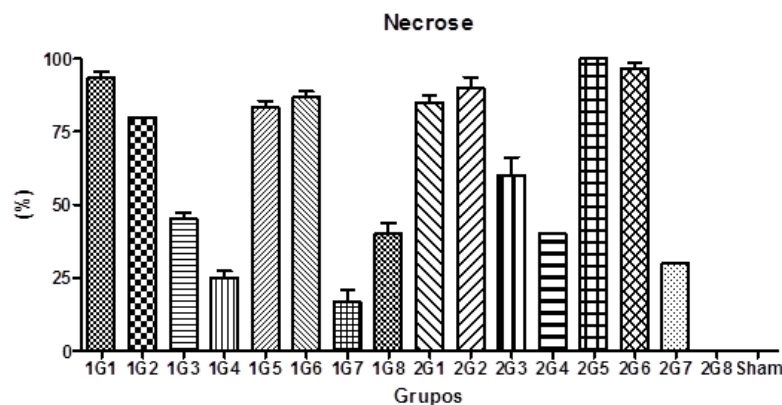
**Figura 12-** Fotomicrografia da região medular renal sob microscopia de fluorescência. A) Marcação inespecífica no filtro verde no grupo controle devido ao processamento (formol e parafina), formando um *background* homogêneo. No grupo tratado, apesar do *background* notam-se células com fluorescência verde (setas), devido à expressão do gene GFP. B) Núcleos corados pelo hoescht observados no filtro azul (UV) em ambos os grupos. C) Sobreposição das imagens de A e B evidenciando a presença das células GFP no grupo tratado (setas). Aumento de 63X.

Em destaque, para a variável necrose, percebeu-se ainda que não houve diferença entre o grupo Sham e Grupo 8 aos 31 dias de observação, o que nos permite inferir que o grau de necrose decresceu, pois havia uma diferença estatística aos 8 dias de observação entre os mesmos grupos.

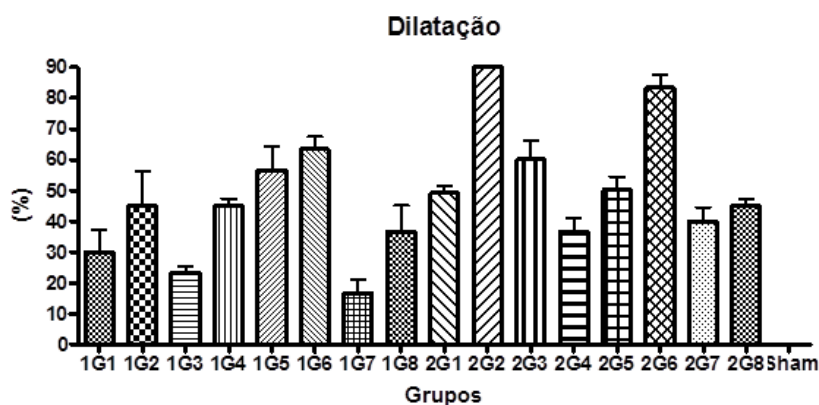
Em relação ao percentual de cilindros hialínicos no interior dos túbulos, aos 31 dias, constatou-se maiores proporções nos grupos tratados com CTM e menores percentuais nos grupos não tratados, os quais exibiram maiores graus de necrose. A presença do cilindro demonstra acúmulo de proteína

intracitoplasmática e que, com a evolução da degeneração tecidual, esse cilindro passa a ser eliminado juntamente com a urina.

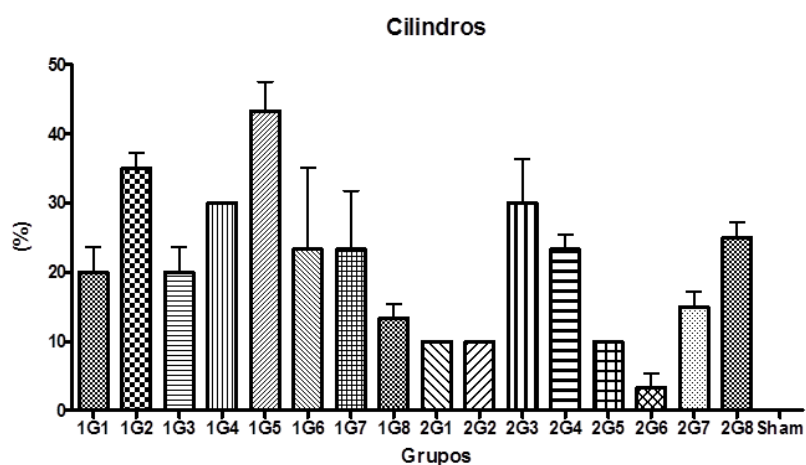
As demais diferenças estão demonstradas nos gráficos abaixo (figuras 13, 14 e 15).



**Figura 13-** Demonstração gráfica da avaliação estatística do grau de necrose, dos grupos experimentais. Os números na frente da letra G correspondem aos diferentes tempos de avaliação, sendo 1 para oitos dias e 2 para 31 dias. Aos oito dias, os grupos 3, 4, 7,8 e sham exibiram menores graus de necrose, se diferenciando dos demais grupos. Aos 31 dias, os menores graus de necrose foram visualizados nos grupos 4, 7, 8 e sham. Não se verificou diferença estatística do grupo sham para o grupo 8 à essa época.



**Figura 14-** Demonstração gráfica da avaliação estatística do grau de dilatação tubular, dos grupos experimentais. Os números na frente da letra G correspondem aos diferentes tempos de avaliação, sendo 1 para oitos dias e 2 para 31 dias. Aos oito dias, os grupos 3, 7 e sham exibiram menores graus de dilatação, se diferenciando dos demais grupos. Aos 31 dias, os menores graus foram visualizados nos grupos 4, 7, 8 e sham.



**Figura 15-** Demonstração gráfica da avaliação estatística do percentual de cilindros hialinos no interior dos túbulos renais, dos grupos experimentais. Os números na frente da letra G correspondem aos diferentes tempos de avaliação, sendo 1 para oito dias e 2 para 31 dias. Aos oito dias, apenas os grupos 8 e sham se diferenciaram dos demais grupos. Aos 31 dias, os menores percentuais foram visualizados nos grupos 6 e sham.

## 6 DISCUSSÃO

Uma das vantagens da utilização de CTM derivadas de tecido adiposo é pela facilidade de aquisição, abundância de tecido para a coleta de células no organismo e pelas características favoráveis de cultura, expansão, e manutenção por várias passagens (Zuk et al.,2002).

A baixa expressão de MHC-I e MHC-II comprovadas pela citometria de fluxo (23,02% e 4,50%, respectivamente), corrobora com as afirmações de Wan et al. (2008) que essas células são consideradas imunoprivilegiadas, capazes de não serem reconhecidas pelo organismo do receptor como não-próprias e de não acarretar rejeição aos transplantes halogênicos.Outra evidência da não ocorrência dessa rejeição, foi o fato dos animais manterem estado clínico e comportamental estável durante todo o experimento.

Os fármacos pré anestésicos utilizados promoveram analgesia e sedação dos animais, como descrito por Okulicz-Kozaryn et al. (2000) e associados ao isoflurano, foram eficazes para indução e manutenção anestésica. Ademais, a preservação da arquitetura estrutural e funcional do parênquima renal e a manutenção dos níveis normais de ureia e creatinina séricas dos animais do grupo sham, permitiu afirmar que o protocolo utilizado não provocou hipotensão e não causou interferência no experimento, semelhante ao afirmado por Roso et al. (2012).

O clipe vascular de titânio foi eficiente para promover isquemia do órgão e permitir o restabelecimento da reperfusão, devido à preservação da integridade dos vasos, quando comparado a outras técnicas estudadas (Branco Filho et al.,2005). Os autores supracitados também identificaram reperfusão através do exame de Doppler colorido e encontraram, macroscopicamente, mudança da coloração renal de vermelho brilhante para tons de vermelhos amarronzados.

O ultrassom bidimensional e o Doppler colorido agregaram informações detalhadas da arquitetura vascular do órgão e da presença, direção e a qualidade do fluxo sanguíneo (Carvalho & Addad, 2009), permitindo a avaliação anatômica e hemodinâmica renal (Engelhorn et al., 2004). Por meio desses exames de imagens também foi demonstrado a eficiência do clipe vascular na indução da isquemia renal, pela não visualização de fluxo sanguíneo, no momento da oclusão. Mudança da ecogenicidade renal de hipoecoico para hiperecoico ao longo do período experimental, como demonstrado por Park et al. (2005), também foram visualizados no presente trabalho.

As mensurações de ureia sérica, após 24 horas, nos grupos experimentais 1 e 5 apresentaram aumento em relação ao grupo controle, o que não foi observado nos demais grupos. De acordo com estudos realizados por Lash et al. (2001), Leal et al. (2001) Liu & Preisig (2002) a manutenção dos valores séricos de ureia, próximo dos valores basais, se justifica devido o rim contralateral está em franco funcionamento para compensar o desequilíbrio inicial, ocorrendo mobilização de mitocôndrias, uma maior demanda de energia, além de ocasionar hipertrofia e hiperplasia celular, numa tentativa de restabelecer a homeostasia do organismo.

Com o avançar do tempo experimental, as dosagens de ureia e creatinina dos animais revelaram azotemia, demonstrando que o rim contralateral apresentava sobrecarga, reduzindo sua taxa de filtração glomerular, não sendo capaz de manter a homeostasia intrarrenal.

Após 31 dias, os níveis de creatinina dos animais do grupo 2, 3, 4, 5, 6 e 8 tenderam a normalidade, quando comparados ao controle. Em contrapartida, os valores de ureia permaneceram elevados, com exceção dos animais dos grupos 4 e 7. Chertow et al. (1995) explicaram esses níveis elevados de ureia devido a necrose tubular aguda com o aumento da difusão retrógrada desse composto seguida da queda na taxa de depuração plasmática de ureia, em relação à depuração da creatinina.

Além das mensurações séricas de ureia e creatinina, a análise da urina e o cálculo do volume urinário são considerados testes importantes na investigação etiológica e funcional da DRA. O sedimento urinário costuma ser pobre em células na doença prerrenal, com formação de cilindros hialinos e pode-se encontrar oligúria ou anúria (Schrier et al. 2004). No presente estudo, a coleta de urina, análise e a determinação do volume urinário não foram realizadas devido as dificuldade de manejo dos animais, uma vez que eram alojados em duplas e em caixa contendo maravalha.

Macroscopicamente, aos oito dias, todos os grupo demonstraram discreto aumento de tamanho do rim obstruído em relação ao contra-lateral. Tucci-Júnior et al. (2008) demonstraram que esse aumento de tamanho é devido aumento de atividade de respiração mitocondrial, como um mecanismo compensatório do órgão isquemiado

Nos grupos tratados com PBS, aos 8 e 31 dias de avaliação, visualizou-se que o parênquima apresentou uma coloração pálida difusa, caracterizando o infarto renal evoluindo para necrose de coagulação. A oclusão dos vasos resultou em infartos hemorrágicos que inicialmente tornou o parênquima cinza amarelado a pálido, em 2 a 3 dias, pela lise dos eritrócitos e a remoção da hemoglobina renal, e essa coloração manteve-se ao longo do tempo (Confer & Panciera, 1998)

Segundo Mota (2005), a patologia mais frequente, subjacente a DRA, é a necrose tubular aguda. No presente estudo, aos 8 dias, nos grupos tratados com PBS (grupos 1, 2, 5 e 6), alterações microscópicas características de necrose, como a presença de debris celulares e perda da arquitetura tubular e glomerular, foram identificadas em quase toda extensão das lâminas. Esses achados evoluíram para necrose intensa, com total perda de vascularização, aos 31 dias, em todos os campos analisados pela microscopia.

Os grupos tratados com CTM apresentaram, aos oito dias, áreas de necrose em menor número de campos quando comparados aos grupos tratados com PBS e, após 31 dias, estas áreas eram extintas. Aos 31 dias, sobretudo nos

animais transplantados pela via intrarrenal, após 48 horas (grupo 8), constatou-se nos campos histológicos avaliados, regiões bem vascularizadas e áreas em franco processo de regeneração, com figuras de mitose e reconstituição glomerular, e arquitetura semelhante ao do grupo sham. Em estudos recentes, Chen et al. (2011) observaram que as CTM, originadas do tecido adiposo, preservaram a integridade arquitetônica do parênquima renal, além de participarem da angiogênese, após lesão de isquemia e reperfusão.

Destaca-se também que os resultados dos grupos que receberam o transplante pela via intrarrenal foram superiores ao encontrado nos grupos do transplante via hematogênica pela inoculação na veia da cauda. Ao se realizar o transplante no local da lesão, proporcionou-se uma maior concentração de células indiferenciadas interagindo com o tecido do hospedeiro, sinalizando por meio dos fatores de crescimento e exercendo o efeito parácrino sobre as demais células do organismo (Kale et al, 2003; Bi et al., 2007; Wan et al., 2008; Feng et al., 2010). Em acréscimo, as células remanescentes no órgão foram estimuladas a se diferenciar, proliferar e se mobilizarem (Duffield et al., 2005; Kopp et al., 2005), contribuindo para o repovoamento celular do epitélio tubular (Kim et al., 2011) a fim de preservar a integridade do parênquima renal e funcionalidade renal.

Os grupos 7 e 8 obtiveram melhores respostas na recuperação morfológica e funcional do rim, quando comparado aos grupos 3 e 4. Isso nos permite inferir que as CTM transplantadas, após 48 horas, interagiram melhor com o nicho hospedeiro, num momento que já se iniciava a resposta inflamatória do tecido lesado. Essa fase inicial presente em todos os processos de reparação tecidual, também libera mediadores químicos, como o interferon gama (INF- $\gamma$ ), o que intensifica a interação das CTM com o nicho, aumentando a sinalização parácrina e o recrutamento de células (Fuchs et al., 2004)

O efeito parácrino das CTM foi reforçado pela visualização de poucas células de expressão GFP pela avaliação por imunofluorescência, contrastando com toda a melhora estrutural e funcional visualizada histologicamente, sobretudo, no grupo 8. De acordo com Lindoso et al. (2011), essa observação está

correta, pois não se espera reposição celular por meio da diferenciação das CTM e sim recuperação funcional das células locais mediada pelos efeitos parácrinos exercidos pelas células indiferenciadas transplantadas.



## 7 CONCLUSÃO

Sob as condições que foram realizadas esse experimento, constata-se que:

- o transplante halogênico de CTM derivadas de tecido adiposo, contribui positivamente para a substituição do tecido necrótico por células tubulares renais, vascularização do parênquima renal e restabelecimento funcional do órgão;
- o transplante pela via intrarrenal foi superior ao transplante pela via hematogena na recuperação do órgão;
- os pacientes transplantados após 48 horas da lesão apresentaram melhores resultados do que aqueles tratados após 24 horas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUELO, J. G. NORMOTENSIVE. Ischemic Acute Renal Failure. *New England Journal of medicine*, 357:797-805. 2007.

BASYUK, E., BERTRAND, E., JOURNOT, L. Alkaline fixation drastically improves the signal of *in situ* hybridization. *Nucleic Acids Research*, v.28, n.10, p. E46, 2000.

BELLOMO, R.; KELLUM, J.A.; RONCO, C. Acute renal failure: time for consensus. *Intensive Care Med*, 27:1685-1688, 2001.

BI, B.; SCHMITT, R.; ISRAILOVA, M.; NISHIO, H.; CANTLEY, L. G. Stromal Cells Protect against Acute Tubular Injury *via* an Endocrine Effect. Section of Nephrology, Department of Medicine, Yale University, New Haven, Connecticut. *Am Soc Nephrol* 18: 2486–2496, 2007.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS S.; ROBEY P. G. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem Cells*, v.19, n.3, p. 180-92, 2001.

BUTCHER, E.C.; Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell Press*, 67:1033-6, 1991.

BRANCO FILHO A.J., BRANCO A.W., MACIEL R.F.; Carvalho R.M.; Garcia M. J.; Control of renal vessels using titanium clips and cotton suture in hand-assisted laparoscopic live donor nephrectomy. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 32 (1), Jan. / Fev, 2005.

BYWATERS, EG, BEALL, D. Crush injuries with impairment of renal function. *British Medical Journal*, 1:427-432, 1941.

CAPLAN, A.I. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*, v.3, p.229-230, 2008.

CARVALHO, C. F.; ADDAD C. A.; Ultrassonografia Doppler em Pequenos Animais. *Interpretação da Imagem Doppler - Cap 3*, pg 15-29 Ed Roca-SP 2009.

CAVADAS V.; TEVES F.; BRANCO F.; OSORIO L.; SOARES J.; LIMA E.; CARVALHO J.M.L.F.; RAMOS M.S.; FRAGA A. Transvaginal-assisted laparoscopic nephrectomy – initial experience. 4: 29–34, 2010.

CONFER, A. W.; PANCIERA, R. J. SISTEMA URINÁRIO. In: CARLTON, W.W.; MC GAVIN, M.D. *Patologia Veterinária Especial*. Porto Alegre; Arte Med, p. 228- 265, 1998.

CORCIONE, A.; BENVENUTO, F.; FERRETTI, E.; GIUNTI, D.; CAPPIELLO, V.; CAZZANTI, F.; RISSO, M.; GUALANDI, F.; MANCARDI, L.G. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, v.107, p.367-372, 2006.

CHAGASTELLES, P. C.; *Biology and applications of mesenchymal stem cells*. v 93, n. 2, p. 113-127(15), 2010.

CHEN, Y.T.; SUN, C. K.; LIN, Y.C. CHANG, L.T.; CHEN, Y.L.; TSAI, T.H.; CHUNG, S.Y.; CHUA, S.; KAO, Y.H.; YEN, C. H.; SHAO, P.L.; CHANG, K.C.; LEU, S.; YIP, H.K. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Protects Kidneys against Ischemia Reperfusion Injury through Suppressing Oxidative Stress and Inflammatory Reaction. *Journal of Translational Medicine*, 9:51 p. 2-17 2011.

CHERTOW, G. M.; SOROKO, S. H.; PAGANINI, E. P.; CHO, K. C.; HIMMELFARB, J.; IKIZLER, T. A.; MEHTA, R. L. Mortality after acute renal failure: models for prognostic stratification and risk adjustment. *Kidney Int.* 70(6):1120-1126; 2006.

DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B.S.; ARGOLO-NETO, N.M. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. *Ceres*, v.56, p.446-450, 2009.

DEVAJARAN, P. Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury. *Journal of American Society of Nephrology*.17:1503-1520. 2006.

DUFFIELD JS, PARK KM, HSIAO LL, KELLEY VR, SCADDEN DT, ICHIMURA T, BONVENTRE JV. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 115:1743–1755, 2005.

ENGELHORN, C. A.; ENGELHORN, A. L.; PULLIG. O papel da ultrasonografia vascular com Doppler colorido na avaliação da hipertensão renovascular. Acurácia da técnica direta de avaliação das artérias renais. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, vol.82 no.5 São Paulo 2004.

FENG, Z.; TING, J.; ALFONSO, Z.; STREM, B. M.; FRASER, J. K.; RUTENBERG, H.C.K.; Pinkernell, K. Fresh and cryopreserved, uncultured adipose tissue-derived stem and regenerative cells ameliorate ischemia–reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*, 25: 3874–3884, 2010.

FERREIRA, A.; SANTOS, R.A.S.; Almeida, A.P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*, v. 38(3 Pt 2), p. 665–668, 2001.

FUCHS, TUMBAR, T.; GUASCH, G.; Socializing with the Neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, v.116, p.769-778, 2004.

GIORDANO, A.; GALDERISI U.;MARINO IR.; From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *Journal Cell Physiol*, v.211, n. 1, p. 27-35, 2007.

HUMPHREYS, B.D.; BONVENTRE, J.V. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *The Annual Review of Medicine*, v.59, p.311–325, 2008.

JACOB, R. Acute renal failure. *Indian journal of anaestheology*, 47:367-372, 2003.

KALE, S.; KARIHALOO, A.; CLARK, P.R.;KASHGARIAN, M.; KRAUSE, D. S.; CANTLEY, L. G. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *Journal Clin Invest*, July 1; 112(1): 42–49, 2003.

KEATING, A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol*, v.13, n. 6, p. 419 – 25, 2006.

KIM J., KYUNG Y. NA., PARK K. M. Intra-renal slow cell-cycle cells contribute to the restoration of kidney tubules injured by ischemia/reperfusion. Department of Anatomy, Kyungpook National University School of Medicine, *Anat Cell Biol*,44:186-193, 2011.

KONOPKA, C.L.; JURACH,A.; WENDER. A.J.O.C.B. Experimental model for the study of chronic renal ischemia in rats. Morphologic, histological and ultra-structural analysis. *Acta Cir. Bras*, vol.22 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2007.

LA MANNA, G.; BIANCHI, F.; CAPPUCILLI, M.; CENACCHI, G.; TARANTINO, L.; PASQUINELLI, G.; VALENTE, S.; DELLA BELLA, E.; CANTONI, S.; CLAUDIA, C.; NERI, F.; TSIVIAN, M.; NARDO, B.; VENTURA, C.; STEFONI, S. Mesenchymal stem cells in renal function recovery after acute kidney injury. Use of a differentiating agent in a rat model, *Cell Transplant*. 20(8):1193-1208; 2011.

LASH LH, PUTT DA, HORKY SJ 3RD, ZALUPS RK. Functional and toxicological characteristics of isolated renal mitochondria: impact of compensatory renal growth. *Biochem Pharmacol*, 62:383-95, 2001.

LANGE. C.; GEL T. F.; Ittrich. H.; Clayton, F.; Nolte-Ernsting C.; Zander, A. R.; Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion–induced acute renal failure in rats. v. 68, p1613-1617.2005

LEAL, D. M.; JUNIOR S.T.; SUAID H. J.; COLOGNA, A. J.; MARTINS, A. C. P.; ROSELINO, J. E.S. Lovastatin and Renal Function After Kidney Ischemia-Reperfusion, *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 16, 1678-2674. 2001.

LEAF A.; Cell swelling: a factor in ischemic tissue injury. *Circulation*, 48(3):455–458, 1973.

LIU, B.; PRESIG, P. A.; Compensatory renal hypertrophy is mediated by a cell cycle-dependent mechanism. *Kidney International*, v. 62, 1650–1658. 2002.

LINDOSO, R. S.; ARAUJO, D. S.; NOVAES, J.A.; MARIANTE, R. M.; VERDOORN, K.S.; MADEIRA, L.F.; NEVES, C.C.; LINDEN, R.; VIEYRA, A.; LAMAS, M.E.; Paracrine Interaction between Bone Marrowderived Stem Cells and Renal Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem. RJ*, 28:267-278, 2011.

MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES A.; Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.33, n.8, p. 881- 887, 2000.

MIAS, C.; TROUCHE, E.; SEGUELAS, M. H.; CALCAGNO, F.; DIGNAT-GEORGE, F.; SABATIER, F.; PIERCECCHI-MARTI, M. D.; DANIEL, L.; BIANCHI, P.; CALISE, D.; BOURIN, P.; PARINI, A.; CUSSAC, D. Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. *Stem Cells*, 26(7):1749-1757; 2008.

MEIRELLES, L.S.; CAPLAN, A.; NARDI, N. B.; In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v.26, p.2287-2299, 2008.

MOTA, P. C. Indicações actuais para biópsia. *Acta Méd Port. Serviço de Nefrologia. Hospital de São Bernardo. Setúbal*,18: 147-151, 2005.

KOPP, H.G.; AVECILLA S.T.; HOOPER; The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)*, 20:349–356, 2005.

NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells. *Blood*.v.110, n.10, p.3499 – 3506, 2007.

OKULICZ-KOZARYN I.; KAMINSKA E.; LUCZAK J. SZCZAWINSKA K, KOTLINSKA-LEMIESZEK A, BACZYK E, MIKOLAJCZAK P. The effects of midazolam and morphine on analgesic and sedative activity of ketamine in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*,11(2):109-25, 2000.

PARK B. K.; KIM S. H.;MOON M. H.; JUNG SII.; Imaging Features of Gray-Scale and Contrast-Enhanced Color Doppler US for the Differentiation of Transient Renal Arterial Ischemia and Arterial Infarction. *Korean J Radiol*, 6(3): 179–184, 2005.

PITTERGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, p. 143-147, 1999.

QUINTAES P.S.L., NORONHA I.L. Revisão/Atualização em Insuficiência Renal Aguda: Papel dos neutrófilos e moléculas de adesão na fisiopatologia da insuficiência renal aguda isquêmica. *J. Bras. Nefrol*, 20(1): 74-77, 1998.

RIBEIRO, R.C.H.M.; OLIVEIRA, G.A.S.A.; RIBEIRO, D.F.; BERTOLIN, D.C.; CESA RINO, C.B.; LIMA, L.C.E.Q.; OLIVEIRA, S.M. Characterization and etiology of the chronic renal failure in a countryside nephrology unit of São Paulo State, 2008.

ROSO N. C.; CORREA RR; CASTIGLIA YM; CARVALHO LR; SCATENA LM; DE SOUZA A.V.; DE OLIVEIRA C.C.; VIANNA P.T.; Caffeic Acid phenethyl ester effects in the kidney during ischemia and reperfusion in rats anesthetized with isoflurane. 44(5):1211-3; 2012.

SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 119: 2204-13, 2006.

SCHIRER, R.W.; WANG, W. POOLE, B.; MITRA, A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(1):514, 2004.

SHAVIT, Y.; FISH, G.; WOLF G.; MAYBURD, E.; MEERSON, Y; YIRMIYA, R; BEILIN, B. The Effects of Perioperative Pain Management Techniques on Food Consumption and Body Weight After Laparotomy. *Anesth Analg*, 101: 1112 -6, 2005.

SINGH, A. P.; MUTHURAMAN A.; JAGGI, A. S.; SINGH, N.; GROVER, K.; DHAWAN, R. Animal models of acute renal failure, 64, 31-44, 2012.

SODRÉ, F.L.; COSTA, J.C.B.; LIMA, J.C.C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

TUCCI JR, S.; MOLINA, C. A. F.; COLOGNA, A. J.; SUAID, H. J.; TIRAPELLI L. F.; CELINI, F. M.; MARTINS, A. C. P. Compensatory renal growth and mitochondrial function: the influence of warm ischemia and reperfusion. *Acta Cir. Bras.* v.23 suppl.1 São Paulo, 2008.

TOGEL, F.; WEISS, K.; YANG, Y.; HU, Z.; ZHANG, P.; WESTENFELDER, C. VASCULOTROPIC, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 292(5):F1626- 1635, 2007.

THADHANI, R.; PASCUAL, M. M.D.; Acute Renal Failure. *The New England Journal of Medicine*, 334:1448-1460, 1996.

TUMELERO, R.T.; DUDA, N.T.; TOGNON, A.P. Thiesen. Prevalence of renal artery stenosis in 1,656 Patients who have undergone cardiac catheterization, v 87, n 3 , 2005.

THADHANI, R.; PASCUAL, M.; BONVENTRE, J.V. Acute renal failure. *The New England Journal of Medicine*, v.334, p.1448–1460, 1996.

WAN, C.D.; WANG,H.B.; LIU,T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, v.7, p.29-33, 2008.

ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M.; BUENO, D. F.; SECCO, M.; JAZEDJE, T.; AMBROSIO, C. E.;PASSOS-BUENO, MR.;MIGLINO, A.; ZATZ, M. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells and Development*, *in proof*, p.1-33, 2009.

ZUK, P. A.; ZHU M.; ASHJIAN P.; UGARTE, D. A.; HUANG,J.;MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells, *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, 4279-4295, 2002.