

**CRYSTHIANE SAVERIANO RUBIÃO ANDRÉ ISHIY**

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE CÉLULAS-TRONCO E DE SUAS  
VESÍCULAS EXTRACELULARES NO TRATAMENTO DE LESÃO  
RENAL INDUZIDA POR ESTENOSE CRÔNICA DA ARTÉRIA RENAL**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.

**2018**

**CRYSTHIANE SAVERIANO RUBIÃO ANDRÉ ISHIY**

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE CÉLULAS-TRONCO E DE SUAS  
VESÍCULAS EXTRACELULARES NO TRATAMENTO DE LESÃO  
RENAL INDUZIDA POR ESTENOSE CRÔNICA DA ARTÉRIA RENAL**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.

**Coordenadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Dra. Gianna Mastroianni Kirsztajn

**Orientadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Mirian Aparecida Boim

São Paulo

2018

## Ficha Catalográfica

Ishiy, Crysthiane Saveriano Rubião André

Comparação dos efeitos de células-tronco e de suas vesículas extracelulares no tratamento de lesão renal induzida por estenose crônica da artéria renal / Crysthiane Saveriano Rubião André Ishiy -- São Paulo, 2018.

XIV, 60f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Nefrologia

Comparison of the effects of stem cells and extracellular vesicles in the treatment of kidney damage induced by chronic renal artery stenosis

1. Hipertensão Renovascular. 2. Doença Renal Crônica. 3. Células-Tronco Mesenquimais. 4. Células-tronco de tecido adiposo. 5. Microvesículas. 6. Exossomos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**DISCIPLINA DE NEFROLOGIA**

**CHEFE DO DEPARTAMENTO**

Profa. Dra. Ana Luisa Godoy Fernandes

**CHEFE DA DISCIPLINA**

Profa. Dra. Ita Pfeferman Heilberg

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Profa. Dra. Gianna Mastroianni Kirsztajn

Este trabalho foi desenvolvido na Disciplina de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dra. Mirian Aparecida Boim e teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (projeto número: 15/23345-9) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

## Sumário

Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
1.1 ESTENOSE CRÔNICA DA ARTÉRIA RENAL .....	2
1.2 CÉLULAS-TRONCO .....	3
1.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS .....	4
1.4 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSO .....	6
1.5 MEIO CONDICIONADO E VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE MSC .....	9
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
3.1 MODELO ANIMAL E PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	13
3.2 INDUÇÃO DA ESTENOSE CRÔNICA DA ARTÉRIA RENAL ESQUERDA.....	14
3.3 ANÁLISE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.....	15
3.4 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSO .....	15
3.5 OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO E ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSO .....	16
3.6 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO E TAMANHO DAS MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS .....	17
3.7 INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA, OSTEOGÊNICA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	17
3.8 CITOMETRIA DE FLUXO .....	18
3.9 ADMINISTRAÇÃO DE ASC, MV OU EX.....	19
3.10 DOSAGENS BIOQUÍMICAS PLASMÁTICAS E URINÁRIAS .....	19
3.11 EXPRESSÃO GÊNICA.....	19
3.12 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOTING</i> .....	21
3.13 ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	22
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
4.1 CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSO.....	23

4.2	CARACTERIZAÇÃO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS DERIVADOS DE ASC.....	25
4.3	ANÁLISE DO TEMPO DE RETENÇÃO DAS ASCs NOS TECIDOS .....	26
4.4	INDUÇÃO DA ESTENOSE CRÔNICA DA ARTÉRIA RENAL E ANÁLISE DA PAS.....	28
4.5	ANÁLISE DO PESO CORPÓREO, DOS RINS E CORAÇÃO .....	29
4.6	PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL .....	30
4.7	EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES DE INTERESSE .....	34
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> O NÚMERO DE MSC DERIVADAS DE MEDULA-ÓSSEA DIMINUI DE ACORDO COM A IDADE .....	8
<b>FIGURA 2.</b> PRINCIPAIS CLASSES DE VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	10
<b>FIGURA 3.</b> TRACEAMENTO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	14
<b>FIGURA 4.</b> CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO DE RATOS WISTAR .....	23
<b>FIGURA 5.</b> CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO .....	24
<b>FIGURA 6.</b> CARACTERIZAÇÃO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS DERIVADOS DE ASC.....	26
<b>FIGURA 7.</b> ADMINISTRAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE ASC MARCADAS COM QTRACKER POR VIA ENDOVENOSA EM DIFERENTES TEMPOS.....	27
<b>FIGURA 8.</b> PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.....	28
<b>FIGURA 9.</b> VALORES DE PESO CORPÓREO, PESO DO CORAÇÃO E PESO DOS RINS .....	29
<b>FIGURA 10.</b> PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL.....	31
<b>FIGURA 11.</b> BALANÇO ELETROLÍTICO.....	33
<b>FIGURA 12.</b> EXPRESSÃO DE mRNA DE COLÁGENO TIPO I ESTIMADO POR RT-PCR QUANTITATIVO ....	35
<b>FIGURA 13.</b> EXPRESSÃO DE mRNA DE TGF $\beta$ ESTIMADO POR RT-PCR QUANTITATIVO .....	36
<b>FIGURA 14.</b> EXPRESSÃO DE mRNA DE SDF-1 $\alpha$ ESTIMADO POR RT-PCR QUANTITATIVO .....	38
<b>FIGURA 15.</b> EXPRESSÃO DE mRNA DE HIF- 1 $\alpha$ ESTIMADO POR RT-PCR QUANTITATIVO .....	39
<b>FIGURA 16.</b> EXPRESSÃO DE mRNA DE IL- 1 $\beta$ ESTIMADO POR RT-PCR QUANTITATIVO .....	41
<b>FIGURA 17.</b> EXPRESSÃO DE mRNA DE IL- 10 ESTIMADO POR RT-PCR QUANTITATIVO .....	42

**LISTA DE TABELAS**

**TABELA 1.** O FENÓTIPO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR DE ASC É SIMILAR AOS DE BMSC .....7

**TABELA 2.** SEQUENCIA DE PRIMERS .....21

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ASCs- Células-tronco de tecido adiposo  
Ang II- Angiotensina II  
ANOVA- Análise de variância  
BMSC- Células-tronco de medula óssea  
bFGF- Fator de crescimento básico de fibroblastos  
CEDEME- Centro de desenvolvimento de modelos experimentais  
Col I- Colágeno tipo I  
cDNA- DNA complementar  
CT- Células-tronco  
CXCR4- Receptor de quimiocinas do tipo 4  
DRC- Doença renal crônica  
DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's medium  
DNA- Ácido desoxirribonucléico  
ESC- Célula-tronco embrionária  
EX- Exossomos  
FSR- Fluxo sanguíneo renal  
HGF- Fator de crescimento de hepatócitos  
HR- Hipertensão renovascular  
HIF-1 $\alpha$ - Fator de indução de hipóxia 1 alfa  
IGF-1- Fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1  
IL-1 $\beta$ - Interleucina 1 beta  
IL-10- Interleucina 10  
iPS- Células-tronco pluripotente induzidas  
IP- Intraperitoneal  
K<sup>+</sup>- Potássio  
MCP-1- Proteína de quimioatração de monócitos  
MMPs- Metaloproteinases  
mRNA- RNA mensageiro  
MC- Meio condicionado  
MSC- Células-tronco mesenquimais

MV- Microvesículas

Na<sup>+</sup>- Sódio

PA- Pressão arterial

PAS- Pressão arterial sistólica

RNA- Ácido ribonucleico

RT- Transcriptase reversa

SRA- Sistema renina angiotensina

SNS- Sistema nervoso simpático

TFG- Taxa de filtração glomerular

TNF $\alpha$ - Fator de necrose tumoral alfa

TGF $\beta$ - Fator de transformação do crescimento beta

VEGF- Fator de crescimento endotelial

VE- Vesículas extracelulares

SDF-1 $\alpha$ - Fator derivado de células estromais 1 alfa

2R-1C- 2Rins-1Clipe

## RESUMO

### **Comparação dos efeitos de células-tronco e de suas vesículas extracelulares no tratamento de lesão renal induzida por estenose crônica da artéria renal**

A estenose crônica da artéria renal é considerada uma das causas mais frequentes de hipertensão renovascular (HR) podendo levar a injúria irreversível do tecido renal e deterioração da função renal. Neste projeto utilizamos o modelo experimental de estenose parcial da artéria renal conhecida como modelo 2 rins - 1 clipe (2R-1C) para induzir HR e hipóxia renal crônica. Diante das alternativas limitadas de tratamentos e a reduzida habilidade angiogênica e regenerativa dos rins, as células-tronco surgem como uma alternativa promissora de terapia para lesão renal pós-isquemia crônica. Estudos prévios mostraram que células-tronco mesenquimais (MSC) obtidas de medula óssea produziram significantes benefícios no modelo 2R-1C através de efeitos parácrinos, estimulando a angiogênese e a imunomodulação. Evidências recentes indicam que o meio condicionado de MSC contendo vesículas extracelulares (VE), incluindo as microvesículas (MV) e os exossomos (EX) têm efeitos terapêuticos semelhantes às próprias MSC. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar e comparar os efeitos das MSC obtidas de tecido adiposo e suas MV e EX na regeneração tecidual no modelo 2R-1C. Metodologia: As MSC foram obtidas do tecido adiposo branco (ASC) de ratos Wistar e foram caracterizadas de acordo com o seu imunofenótipo e multipotencialidade. As vesículas extracelulares (VE) foram isoladas do meio de cultura das ASC e separadas, de acordo com o tamanho, em MV e EX por ultracentrifugação. As vesículas foram identificadas por rastreamento de nanopartículas (*Nanosight*) e analisadas pela presença de marcadores específicos para cada tipo de VE por *western blotting*. Ratos Wistar machos foram divididos em cinco grupos: 1- Grupo Sham; 2- Grupo Estenótico; 3- Grupo Estenótico + ASCs; 4- Grupo Estenótico + MV; 5- Grupo Estenótico + EX. As ASC, MV e EX foram infundidas através da veia caudal na 3ª e 5ª semanas após o clampeamento da artéria renal esquerda. A pressão arterial sistólica (PAS) foi acompanhada semanalmente. Após seis semanas foram coletados urina de 24 horas e sangue para as análises bioquímicas. Os rins foram retirados para análise de biologia molecular. A expressão gênica foi verificada por PCR quantitativo em tempo real analisando os seguintes marcadores: Colágeno I (Col I), TGF $\beta$ , HIF-1 $\alpha$

SDF-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 no córtex e na medula renal. Resultados: Análise por citometria de fluxo mostrou que após 48 horas as ASCs ficaram retidas principalmente nos rins estenótico e contralateral seguido pelos pulmões e coração. Após 15 dias a presença de ASC diminuiu significativamente nos pulmões, mas ainda estavam presentes em ambos os rins. Os animais estenóticos apresentaram um aumento progressivo da PAS enquanto os grupos tratados com ASC, MV e EX apresentaram uma estabilização da PAS em graus semelhantes entre os diferentes tratamentos. A creatinina plasmática foi similar entre os grupos, entretanto, os animais estenóticos desenvolveram proteinúria a qual foi reduzida pelo tratamento com ASC e MV, mas não com EX. Houve um aumento na expressão de Col I e TGF $\beta$  no rim estenótico e contralateral (córtex e medula) o qual foi reduzido pelo tratamento com ASC, MV e EX. Os animais tratados com ASC apresentaram um aumento significativo na expressão do marcador de *homing* de células-tronco SDF1- $\alpha$  no córtex e medula tanto no rim estenótico quanto no rim contralateral, os grupos tratados com MV e EX também apresentaram aumento, embora menor, na expressão de SDF1- $\alpha$  em ambos os rins. O marcador de hipóxia HIF1- $\alpha$  apresentou aumento no rim estenótico e os tratamentos com ASC, MV e EX foram eficientes em reduzir este marcador. Houve um aumento da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  em ambos os rins dos animais hipertensos sendo eficientemente reduzida nos dois rins principalmente pelo grupo tratado com ASC e os tratamentos com ASCs, MV e EX foram capazes de induzir um aumento na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10. Em conclusão, os resultados sugerem que as VE liberadas por ASC produziram bons resultados, porém com menor eficiência em alguns parâmetros quando comparado às ASC. A utilização das ASC produziu efeitos mais eficazes neste modelo de hipóxia crônica comparados à MV e EX e, portanto, a utilização das VE em substituição às células deve ser avaliada na dependência do parâmetro a ser corrigido.

**Palavras-chave:** hipertensão renovascular, doença renal crônica, células-tronco mesenquimais, células-tronco de tecido adiposo, microvesículas, exossomos.

**ABSTRACT****Comparison of the effects of stem cells and extracellular vesicles in the treatment of kidney damage induced by chronic renal artery stenosis**

Chronic renal artery stenosis is considered one of the most frequent causes of renovascular hypertension (RH), which can lead to irreversible renal tissue damage and deterioration of renal function. In this project we used the experimental model of partial stenosis of the renal artery known as 2 kidneys - 1 clip model (2K-1C) to induce RH and chronic renal hypoxia. Faced with limited treatment alternatives and reduced angiogenic and regenerative ability of the kidneys, stem cells appear as a promising alternative therapy for chronic renal ischemia. Previous studies have shown that mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from bone marrow have produced significant beneficial effects on the 2K-1C model through paracrine effects, stimulating angiogenesis and immunomodulation. Recent evidence indicates that MSC conditioned medium containing extracellular vesicles (EV), including microvesicles (MV) and exosomes (EX) released by MSC have therapeutic effects similar to MSCs. Therefore, the aim of this study was to investigate and compare the effects of MSC obtained from adipose tissue and MV and EX on tissue regeneration in the 2K-1C model. Methods: MSCs were obtained from white adipose tissue (ASC) of Wistar rats and were characterized according to their immunophenotype and multipotentiality. Extracellular vesicles (EV) were isolated from the ASC culture medium and size-separated in MV and EX by ultracentrifugation. Vesicles were identified by nanoparticles tracking using Nanosight and analyzed by the presence of specific markers for each type of EV by western blotting. Male Wistar rats were divided into five groups: 1- Sham Group; 2- Stenotic Group; 3- Stenotic Group + ASCs; 4- Stenotic Group + MV; 5- Stenotic Group + EX. The ASC, MV and EX were infused through the tail vein at the 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> weeks after clamping. Systolic blood pressure (SBP) was monitored weekly. After six weeks, 24-hour urine and blood were collected for biochemical analyzes. Kidneys were removed for molecular biology analysis. Gene expression was verified by quantitative real-time PCR and analyzed using the following markers: Collagen type I (Col I), TGF $\beta$ , HIF-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 in the renal cortex and medulla. Results: Flow cytometry analysis

showed that after 48 hours the ASCs were retained mainly in the stenotic and contralateral kidneys followed by lungs and heart. After 15 days the presence of ASC decreased significantly in the lungs but was still present in both kidneys. The stenotic animals showed a progressive increase in SBP while the groups treated with ASC, MV and EX showed a stabilization of PAS in similar degrees between the different treatments. Plasma creatinine was similar between groups, however, the stenotic animals developed proteinuria which was reduced by treatment with ASC and MV an effect not observed in the EX treated group. There was an increase in the expression of Col I and TGF $\beta$  in the stenotic and contralateral kidney (cortex and medulla) which was reduced by the treatment with ASC, MV and EX. ASC-treated animals showed a significant increase in expression of the stem cells homing marker (SDF1- $\alpha$ ) in the cortex and medulla in the stenotic and contralateral kidney, the MV and EX treated groups also showed an smaller increase in the expression of SDF1- $\alpha$  in both kidneys. The hypoxia marker (HIF1- $\alpha$ ) presented an increase in the stenotic kidney and the treatments with ASC, MV and EX were efficient in reducing this marker. There was an increase of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  in both kidneys of the hypertensive animals being efficiently reduced in both kidneys mainly by the ASC treated group and the treatments with ASCs, MV and EX was able to induce an increase the anti-inflammatory cytokine IL-10. In conclusion, the results suggest that the EV released by ASC produced good results, but with lower efficiency in some parameters when compared to ASC. The use of ASCs has produced more effective effects in this model of chronic hypoxia and the use of EV in replacement to cells should be evaluated depending on the parameter to be corrected.

**Keywords:** renovascular hypertension, chronic kidney disease, mesenchymal stem cells, adipose derived stem cells, microvesicles, exosome.

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Estenose crônica da artéria renal

A estenose crônica da artéria renal é considerada uma das causas mais frequentes de hipertensão renovascular (HR) [1], podendo levar, através da hipóxia crônica, a injúria irreversível do tecido renal e deterioração da função renal. A prevalência de HR é estimada em 2% da população geral de hipertensos e esta se tornou uma importante causa de doença renal terminal especialmente em pacientes idosos [1-4].

Neste projeto pretendemos utilizar o modelo experimental de estenose parcial da artéria renal conhecida como modelo 2 rins-1 clipe (2R-1C), desenvolvido por *Goldblatt et al.*, para induzir HR. No modelo de Goldblatt a aplicação de um clipe constritor na artéria renal em cães levou a uma redução de aproximadamente 50% do fluxo sanguíneo renal (FSR), diminuindo a taxa de filtração glomerular (TFG) no rim isquemiado [5-7]. A redução do FSR resulta em redução na pressão de perfusão, ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) e ativação do sistema nervoso simpático (SNS), fatores que contribuem para a gênese e manutenção da hipertensão arterial, respectivamente. O entendimento sobre a participação do SRA nesta condição fisiopatológica avançou através do resultado do desenvolvimento de vários agentes farmacológicos que bloqueiam de forma eficaz componentes desta cascata na melhora das alterações hemodinâmicas sistêmicas [8-10], porém essas estratégias não impedem os efeitos renais da hipóxia crônica como a rarefação vascular, inflamação e fibrose no rim isquemiado [8, 11-15].

O aumento dos níveis de angiotensina II (Ang II) no modelo 2R-1C produz maior retenção de sódio, expansão do volume extracelular, aumento da resistência vascular sistêmica, aumento da produção de aldosterona e do hormônio antidiurético, ativação do SNS, lesão renal e fibrose. Apesar do avanço no entendimento da fisiopatologia da HR, o controle da hipertensão renovascular ainda é crítico, e a eficácia das drogas anti-hipertensivas ainda não alcançou um nível satisfatório onde 60% dos pacientes são refratários ao tratamento [15]. Assim, mais do que o controle da pressão arterial, a restauração do fluxo sanguíneo renal e reestruturação do parênquima renal são fundamentais no tratamento da doença

renal em consequência à isquemia crônica, o que poderia resultar na normalização da PA [5, 8, 11, 15]. Além disto, estudos clínicos reportaram que mesmo a resolução da estenose através de angioplastia tem efeito limitado e frequentemente não demonstra qualquer efeito sobre a recuperação da função renal [16-19].

Diante das alternativas limitadas de tratamentos e a reduzida habilidade angiogênica e regenerativa do rim, as células-tronco (CT) surgem como um alternativo potencial de terapia para lesão renal pós-isquemia crônica.

## 1.2 Células-Tronco

As células-tronco são caracterizadas pelo seu fenótipo indiferenciado, sua habilidade de auto-renovação, elevada capacidade proliferativa e seu potencial de diferenciação [20-22]. Tais células podem ser divididas em dois principais grupos, as células-tronco pluripotentes (células-tronco embrionárias e células-tronco pluripotentes induzidas) e as multipotentes (adultas/hematopoiéticas) incluindo as células mesenquimais.

Com base em sua origem, as células-tronco são divididas em diferentes categorias. As células-tronco de origem embrionária (do inglês, *Embryonic Stem Cells* - ESC) são células pluripotentes isoladas a partir do blastocisto e possuem a capacidade de gerar células das três linhagens germinativas [23, 24] apresentam como principais características sua alta taxa proliferativa, auto-renovação e alto potencial terapêutico, entretanto sua utilização é limitada pela sua capacidade de formação de teratoma *in vivo* e pela dificuldade e obtenção devido aos problemas éticos relacionados à destruição de embriões humanos [25].

As células-tronco pluripotente induzidas (do inglês, *Induced Pluripotent Stem Cells*- iPS) foram geradas a partir de células adultas reprogramadas para expressar 4 fatores de transcrição (*OCT 3/4*, *SOX2*, *KLF4* e *c-MYC*) [26]. Este tipo celular possui características similares as ESC como auto-renovação, alta taxa de proliferação e diferenciação [27], tornando estas células uma fonte atraente nas áreas de medicina regenerativa.

As células-tronco mesenquimais por sua vez, faz parte do grupo das células-tronco adultas sendo encontrada praticamente em todos os tecidos adultos, são

células multipotentes, fusiformes com formato semelhante a fibroblastos. Estas células também possuem a capacidade de auto-renovação e alta capacidade de proliferação *in vitro*. A sua facilidade de obtenção e diferenciação torna-se um tipo celular importante na medicina regenerativa [28, 29].

### 1.3 Células-Tronco Mesenquimais (MSC)

As células-tronco mesenquimais (MSC) foram originalmente descritas em 1970 por Friedenstein [30] o qual utilizou células derivadas de medula óssea demonstrando que estas células apresentam características morfológicas semelhantes a fibroblastos e possuem a capacidade de formar unidades de colônia *in vitro*. A partir deste momento, Caplan e colaboradores em 1991 definiram estas células como células com capacidade de gerar linhagens celulares diferentes de sua origem e estabeleceram o termo células-tronco mesenquimais (do inglês, *Mesenchymal Stem Cells*-MSC) [31].

As MSC são células adultas multipotentes que possuem um menor potencial de formação de teratomas sendo excelentes candidatas para a regeneração de tecidos devida suas características como divisão moderada e sua multipotencialidade [20, 32]. As MSCs podem ser obtidas de várias fontes, incluindo medula óssea, estroma medular, tecido adiposo, periósteo, membrana e fluido sinovial, músculo esquelético, derme, dente decidual, cartilagem articular, sangue do cordão umbilical, placenta, líquido amniótico, tecidos fetais, sangue periférico e fígado [28, 29, 31, 33-43].

A *International Society for Cellular Therapy* estabeleceu critérios para a definição das MSC. Estas células devem apresentar a capacidade de diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica (multipotencialidade), aderência ao plástico e expressão específica de antígenos de superfície (Ag) positivos (>95%) para agrupamento de diferenciação (do inglês, *Cluster of Differentiation* - CDs): 13, 29, 44, 73, 90, 105 e 166, e negativos (<2%) para CDs 11, 11b, 14, 31, 34, 45 e 62e [29, 32]. Entretanto algumas diferenças são existentes em células isoladas de diferentes origens.

As MSC possuem diversas características, entre elas a capacidade de migrar (do inglês, *homing*) para as áreas lesionadas, e são atraídas através de fatores de crescimento e quimiocinas liberadas pela lesão tecidual. As MSC quando atingem o local da lesão, secretam fatores tróficos e imunomodulatórios [44] auxiliando no reparo tecidual através de efeitos parácrinos. O tecido lesado produz citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento [45] que estão envolvidos no *homing* de células-tronco. Além disto, as MSC secretam moléculas e expressam receptores que influenciam no processo de migração *in vivo*, entre eles o fator derivado de células estromais (do inglês, *Stromal-cell-derived factor 1 alfa* - SDF-1 $\alpha$ ) [46] e o seu receptor conhecido como receptor de quimiocinas do tipo 4 (do inglês, *Chemokine receptor type 4* - CXCR4) [47]. A indução do SDF-1/CXCR4 após isquemia é mediado pelo fator de indução de hipóxia (do inglês, *Hypoxia-inducible factor-1* - HIF-1), um fator de transcrição que atua como mediador central de resposta celular durante condições de hipóxia [48]. As metaloproteases (MMPs) também são importantes proteases que estão envolvidas no processo de migração celular e também estão envolvidas no processo de *homing* de MSC juntamente com o aumento das citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ) que regulam a migração de MSC através do aumento de expressão de MMPs [48].

Vários trabalhos vêm demonstrando que as MSC possuem, através de efeitos parácrinos, a capacidade de modular o sistema imunológico [44], reduzindo a inflamação [49], contribuindo para a tolerância a transplantes, além de participar de mecanismos de regeneração celular e angiogênese. [15, 50-52].

Trabalhos prévios realizados em nosso laboratório utilizando células-tronco derivadas de medula óssea (do inglês, *Bone Marrow Stem Cell* - BMSC) no modelo 2R-1C em ratos, demonstrou que o tratamento com estas células preveniu o aumento progressivo da pressão arterial, reduziu a fibrose, proteinúria e promoveu melhora na rarefação microvascular no rim estenótico [15]. Por outro lado, o rim contralateral apresenta características de um rim hipertenso o qual está constantemente exposto a elevados níveis de pressão sanguínea, apresentando alterações estruturais e funcionais. O tratamento com BMSC também melhorou a morfologia, reduziu fibrose e atenuou a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias no rim contralateral [53].

Estes trabalhos utilizando BMSC promoveram um avanço na recuperação da função renal pós-isquemia crônica e devido aos significativos efeitos benéficos destas células se faz necessário testar a efetividade terapêutica de células-tronco mesenquimais obtidas de outras origens, como por exemplo, do tecido adiposo, o qual representa uma fonte mais acessível comparado à medula óssea.

#### **1.4 Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ASCs)**

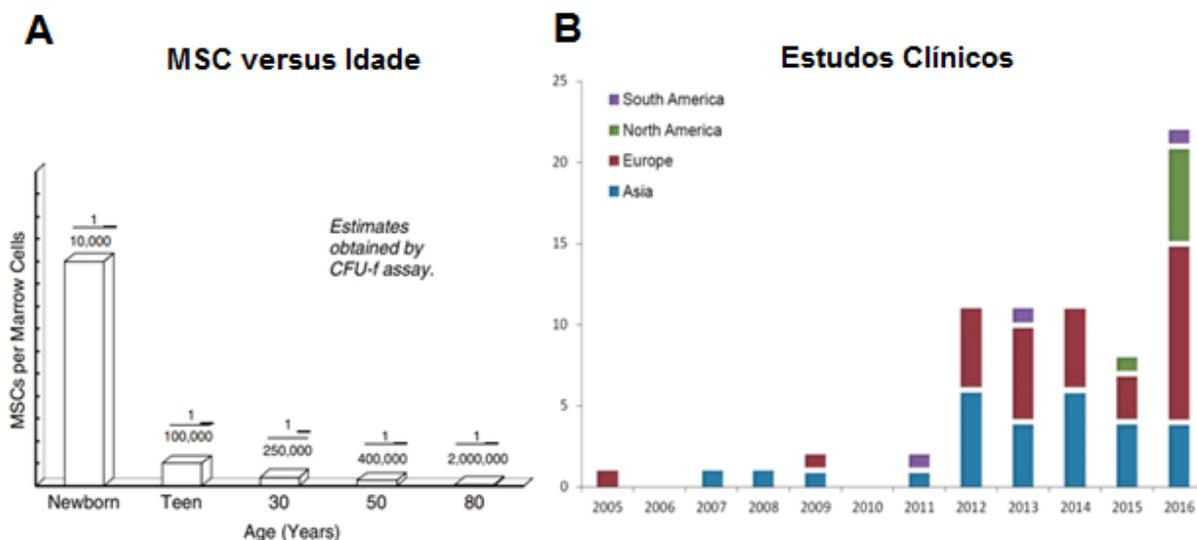
O tecido adiposo é derivado da camada mesodermal do embrião e se desenvolve durante os períodos pre e pós-natal [54]. Recentemente, o tecido adiposo foi reconhecido como uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais, este tecido apresenta algumas características relevantes por ser facilmente acessível e apresentar alta reprodutibilidade e abundância [36]. As células-tronco de tecido adiposo (do inglês, *Adipose Stem Cells* - ASCs) foram identificadas, isoladas e caracterizadas por Zuk *et al.*, 2002 utilizando lipoaspirado humano levando o conhecimento de que o tecido adiposo poderia ser uma fonte de MSC alternativa à medula óssea [35]. Após a expansão *in vitro*, as ASCs apresentam morfologia fibroblastóide similar à observada em BMSC. Além disso, as ASCs apresentam uma série de marcadores de superfície similares à BMSC (Tabela 1) apresentando padrão de expressão positiva para o marcador CD 29 (adesão), CD 105, CD90, CD73, CD44 e STRO-1 (mesenquimais) e padrão negativo para os marcadores CD34, CD45 (hematopoiéticos), CD31 (endotelial) [55, 56]. As ASCs assim como as BMSC, também podem se diferenciar *in vitro* em linhagens osteogênicas, adipogênicas, neurogênica, miogênica e condrogênica quando cultivadas com fatores específicos [36, 57].

Marcador de superfície	Padrão de expressão	
	ASC	BMSC
CD29	+	+
CD31	-	-
CD34	-	-
CD44	+	+
CD45	-	-
CD73	+	+
CD90	+	+
CD105	+	+
STRO-1	+	+

**Tabela 1: O fenótipo de marcadores de superfície celular de ASC é similar aos de BMSC. Adaptado de Strem *et al* 2005 [55].**

As ASCs apresentam algumas características que as tornam melhores candidatas a terapia celular do que as BMSC. Grandes quantidades de tecido adiposo podem ser extraídas em um único procedimento cirúrgico simples e de fácil acesso [58], esta diferença torna as ASCs uma fonte mais atraente para aplicações clínicas devido à sua facilidade de obtenção. Foi demonstrado que as ASCs possuem uma maior capacidade proliferativa *in vitro* [59] e secretam diversas interleucinas e fatores tróficos similares a BMSC entre eles o fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1 (IGF-1), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), proteína de quimioatração de monócitos (MCP-1), fator derivado de células estromais 1 alfa (SDF1- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) sendo que alguns deles as ASC secretam em maiores quantidades, como fator de crescimento endotelial (VEGF) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) quando comparadas as BMSC [60].

Análises comparativas utilizando MSC obtidas a partir de tecido adiposo e medula-óssea mostrou que as ASCs não apresentam diferenças em relação à morfologia, fenótipo, taxa de isolamento de MSC, frequência de colônias e capacidade de diferenciação *in vitro* [61, 62]. Adicionalmente, foi demonstrado que o tecido adiposo apresenta um número maior células-tronco mesenquimais/mL de tecido obtido quando comparado à medula óssea [63] e as MSC encontradas na medula óssea apresentam um declínio de acordo com a idade do doador o que pode levar a problemas no uso autólogo (Figura 1A) [64, 65].



**Figura 1:** O número de MSCs derivadas de medula-óssea diminui de acordo com a idade (A) Desde a primeira publicação em 2005, houve um crescimento constante nos estudos clínicos utilizando células-tronco derivadas de tecido adiposo (B) Adaptado de Caplan *et al* 2009 [65] e Toyserkani *et al.*,2017 [66]

Este tipo celular torna-se candidato à medicina regenerativa devido à sua facilidade de obtenção, grande quantidade de células podem ser extraídas em um único procedimento cirúrgico apresentando mínimo desconforto ao paciente comparado à BMSC que levam a dor e morbidade ao paciente. O procedimento de obtenção das células de tecido adiposo em cirurgia pode ser repetido e as células extraídas podem ser cultivadas e expandidas *in vitro* para obtenção do número necessário de células para terapia celular [35, 59, 67-69].

Até o momento, diversos estudos utilizando modelos animais já comprovaram o potencial de diferenciação *in vivo* deste tipo celular, demonstrando desta forma a importância desta fonte de células-tronco e sua utilização em modelos animais e na aplicação clínica [68, 70-73].

O primeiro estudo clínico o qual utilizou ASC em terapia celular foi publicado em 2005 seguido de um crescimento expansivo desde 2012 até 2016 (Figura 1B) [66]. Um estudo pré-clínico utilizando ASC foi o primeiro em testar a eficácia do transplante autólogo de MSC em pacientes com doença renovascular. O tratamento com ASC em humanos demonstrou ser bem eficaz em aumentar o fluxo sanguíneo renal, reduzir a hipóxia e estabilizar a taxa de filtração glomerular três meses após o

tratamento. Nenhum efeito adverso foi observado após o tratamento o que demonstra um grande avanço na pesquisa clínica utilizando ASC [74].

### **1.5 Meio condicionado e vesículas extracelulares derivados de MSC**

As MSC secretam diversos fatores de crescimento e citocinas que promovem efeitos anti-inflamatórios, imunossupressores, anti-apoptóticos e proliferativos. O conjunto de substâncias secretadas pelas células é denominado “secretoma” e o meio condicionado (MC) obtido de MSC produz um efeito protetor semelhante às MSC em diversos modelos de lesão renal aguda [75-77].

Neste cenário, diversos estudos demonstraram que o MC foi capaz de reduzir a injúria tubular renal [75, 78]. Em modelos de lesão renal aguda o MC induziu significativamente a proliferação celular e inibiu a necrose tubular aumentando a velocidade de recuperação da função renal, este efeito protetor parece ser mediado por diversas substâncias, incluindo RNAs, transportados por vesículas extracelulares presentes no MC [79]. Assim, a administração de MC pode ter efeitos tão benéficos quanto às MSC com a significativa vantagem de reduzir problemas associados com a incompatibilidade de transplante alogênico da MSC e formação tumoral [80-82], apresentando, portanto um enorme potencial clínico.

As vesículas extracelulares (VE) são produzidas e liberadas por diversos tipos celulares incluindo as MSC, e contém diversas moléculas ativas como fragmentos de DNA, mRNAs, microRNAs e proteínas. Estas microestruturas têm papel relevante nos mecanismos de comunicação celular [83, 84]. As VE podem influenciar outras células através de diversos mecanismos como interação com receptores de superfície, estimulação direta, transferência de material genético e proteínas. Estas vesículas consistem em uma população heterogênea que diferem entre si de acordo com sua origem, tamanho e taxa de sedimentação [85]. Existem três classes principais de VE: as microvesículas, exossomos e corpos apoptóticos [83].

Os corpos apoptóticos são partículas de tamanho entre 1000-5000nm e são liberados através da fragmentação da membrana plasmática durante o processo de apoptose (Figura 2C) [86]. O segundo grupo é formado pelas microvesículas (MV), são partículas com tamanho entre 100-1000nm de diâmetro representando uma população relativamente heterogênea de vesículas com diferentes formatos. A

biogênese ocorre a partir de um brotamento da membrana citoplasmática sendo liberado para o espaço extracelular (Figura 2B) [87].

Os exossomos (EX) por sua vez, possuem tamanho entre 40-100nm, são, portanto, vesículas menores sendo secretados por diversos tipos celulares. Sua biogênese ocorre dentro de corpúsculos intracelulares multivesiculares e liberados após a fusão com a membrana citoplasmática (Figura 2A) [87].



**Figura 2: Principais classes de vesículas extracelulares (VE).** Os exossomos são gerados por meio de um brotamento da membrana endossomal. Como elas se acumulam, elas formam os corpos multivesiculares (MVB) que por sua vez, transitam do citosol até a superfície celular onde ocorre a fusão com a membrana liberando o conteúdo exossomal para o espaço extracelular **(A)**. As microvesículas (MV) são formadas pelo brotamento da membrana plasmática **(B)** os corpos apoptóticos são formados através de fragmentações da membrana plasmática e contém fragmentos nucleares **(C)**. Adaptado de Kanada *et al* 2016 [88]

As VE provenientes de MSC induzem efeitos tão eficientes quanto as MSC na reconstrução tecidual, apresentando um efeito renoprotetor principalmente em modelos animais com doença renal aguda restaurando a morfologia, promovendo angiogênese, proliferação celular, reduzindo a fibrose e restaurando a função renal [89-91] e este efeito foi observado principalmente em modelos agudos de doença renal, porém em modelos crônicos o estudo de vesículas extracelulares ainda foi pouco explorado, por isso pretendemos abordar esta nova terapia neste modelo crônico de isquemia renal para comparar o uso de microvesículas e exossomos com os efeitos da administração das MSC obtidas de tecido adiposo.

Considerando os benefícios da utilização de terapias celulares incluindo MSC de medula óssea, até o momento descrito, faz-se necessário o aprimoramento deste

tipo de tratamento com o intuito de reduzir os efeitos colaterais e aumentar a eficiência terapêutica. Neste contexto, este estudo pretende testar a hipótese de que MSC obtidas de tecido adiposo bem como suas microvesículas e exossomos possuam efeitos terapêuticos semelhantes aos obtidos com MSC de medula óssea.

# OBJETIVOS

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar e comparar os efeitos e a eficiência das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e suas vesículas extracelulares na lesão renal induzida por estenose crônica da artéria renal utilizando o modelo 2R-1C.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1- Isolar, caracterizar e avaliar a distribuição de células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASCs) nos diferentes órgãos. Isolar e caracterizar as vesículas extracelulares (VE) derivadas das ASC e avaliar seu potencial terapêutico
- 2- Comparar a eficiência terapêutica de ASC e VE no tratamento dos animais estenóticos com relação à:
  - função renal dos animais por dosagem bioquímica plasmática e urinária;
  - expressão gênica verificada por PCR em tempo real analisando os seguintes marcadores: Colágeno tipo I, TGF $\beta$ , HIF-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10.

# MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA-UNIFESP) número 6972080514.

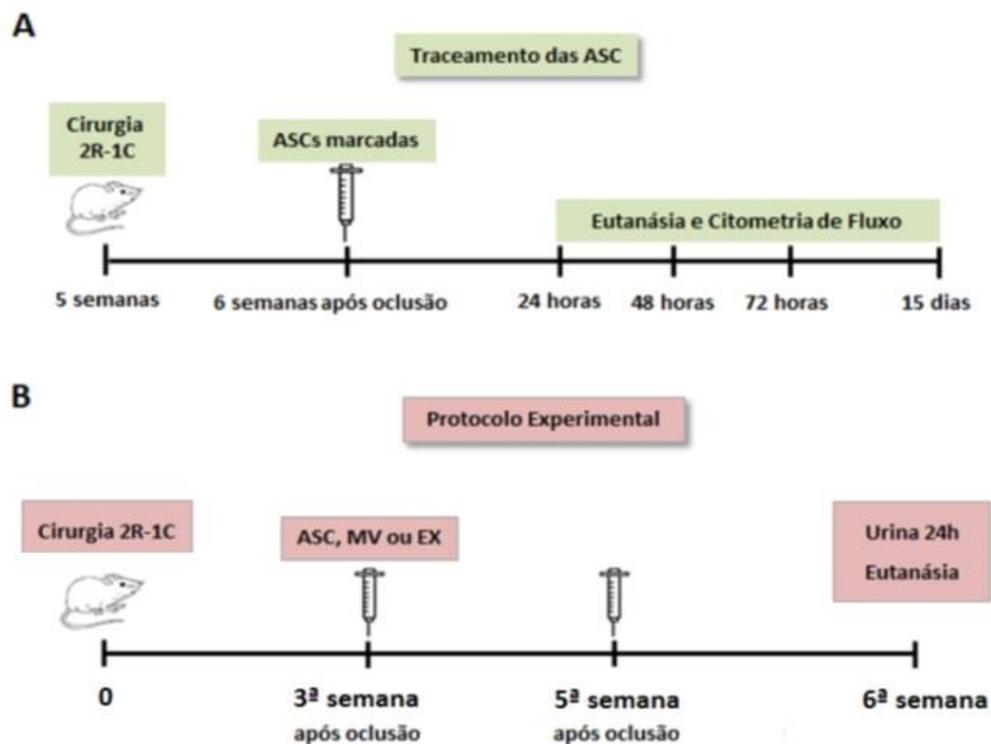
#### 3.1 Modelo Animal e protocolo experimental

Ratos Wistar machos (150-180g) foram fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME-UNIFESP) e mantidos em salas especiais com temperatura controlada (23°C), ciclo claro/escuro (12h/12hs), ração padrão e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- I- **Grupo Sham:** animais foram manipulados sem obstrução da artéria renal
- II- **Grupo Estenótico:** animais com estenose da artéria renal receberam tampão PBS via endovenosa
- III- **Grupo Estenótico + ASC:** animais estenóticos tratados com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ASC)
- IV- **Grupo Estenótico + MV:** animais estenóticos tratados com microvesículas (MV) derivadas de ASCs
- V- **Grupo Estenótico + EX:** animais estenóticos tratados com exossomos (EX) derivados de ASCs

Os animais foram seguidos por seis semanas após o clampeamento da artéria renal esquerda. As ASCs, MV ou EX foram administradas em dois períodos, na 3<sup>a</sup> semana e na 5<sup>a</sup> semana após o clampeamento (Figura 3 A). Para avaliar a migração e o tempo de retenção das ASCs nos tecidos, as células foram administradas seis semanas após a estenose, sendo estabelecidos quatro grupos conforme o período após a administração das ASCs (24 horas, 48 horas, 72 horas e 15 dias) (Figura 3 B).



**Figura 3: Traceamento e Protocolo Experimental.** Análises de migração e tempo de retenção das ASC nos tecidos (A) Protocolo experimental de tratamento dos animais estenóticos utilizando célula-tronco derivada de tecido adiposo (ASC), microvesículas (MV) e exossomos (EX) derivados de ASC (B).

### 3.2 Indução da estenose crônica da artéria renal esquerda (2R-1C)

Os animais foram anestesiados com xilazina (Sedafarm, Farmabase Saúde Animal Lta, Brasil - 20 mg/ kg) e ketamina (Agener, União, Brasil - 40 mg/ Kg), por injeção intraperitoneal (IP). A artéria renal esquerda foi parcialmente ocluída por um clipe de prata (0,2 mm de abertura) constrito o suficiente para reduzir o fluxo sanguíneo renal em cerca de 50% promovendo uma condição necessária para desenvolver a hipertensão renovascular e induzir um quadro de hipóxia crônica [5]. Ratos submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém, sem oclusão parcial da artéria renal (cirurgia fictícia) foram considerados como animais controles (Sham). Após a cirurgia os animais foram mantidos em gaiolas individuais e observados por 24 horas. Nesse período, analgésico foi administrado para reduzir o desconforto pós-operatório. Após a recuperação cirúrgica os animais foram transferidos para gaiolas

coletivas respeitando-se os grupos específicos e seguidos por seis semanas. Ao final do protocolo foram colocados em gaiola metabólica para coleta de urina 24 horas. Em seguida foram anestesiados com xilazina/ketamina para obtenção de sangue por punção da aorta abdominal e retirada dos rins para análise histológica e de biologia molecular.

### **3.3 Análises da pressão arterial sistólica**

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida semanalmente após a oclusão da artéria renal por plestimografia (PowerLab-ADInstruments, Castle Hill, Australia). Cada animal foi mantido por 10 minutos em uma caixa de aquecimento para promover vasodilatação da artéria caudal e facilitar a medida da PAS através de um sensor conectado a um sistema computadorizado (LabChart-ADInstruments, Castle Hill, Australia) contendo um software específico de integração. Este procedimento foi realizado três vezes e a média semanal dos valores foi analisada durante seis semanas.

### **3.4 Isolamento e cultivo das células tronco mesenquimais de tecido adiposo (ASCs)**

Ratos Wistar machos foram utilizados como doadores de ASCs. Os animais foram eutanasiados através de uma overdose de xilazina/cetamina seguida por perfuração do diafragma. O tecido adiposo branco foi removido da região gonadal, sob condições estéreis e lavado com PBS (Tampão fosfato salino). Em seguida, o tecido foi digerido mecânica e enzimaticamente a 37°C por 40 minutos, sob agitação constante, numa solução contendo colagenase tipo 1A 0,1 % (C- 2674; Sigma), suplementado com 20mg de albumina bovina sérica (Sigma Aldrich, St Louis Missouri) em 2mL de DMEM-low glicose para cada grama de tecido adiposo a ser digerido. A atividade enzimática foi interrompida com o mesmo volume de SFB (Soro Fetal Bovino – Thermo Fisher, Massachusetts, EUA). O tecido adiposo digerido foi centrifugado a 400g por 15 min formando um precipitado de alta densidade o qual foi ressuspenso em meio de cultura DMEM-low glicose suplementado com 10% de SFB e 1% penicilina/estreptomicina. Posteriormente, esse volume foi plaqueado em

placas de 10 mm de diâmetro e armazenado em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas e, em seguida, todo meio contendo células não-aderentes foi descartado. Um novo meio de cultura com as mesmas concentrações de SFB e antibiótico foi então adicionado. Durante os três dias consecutivos à extração, o meio de cultura foi trocado a cada 24 horas, de forma a remover gradativamente as hemácias e debris celulares oriundos da extração.

### **3.5 Obtenção do meio condicionado e isolamento de microvesículas e exossomos derivados de células tronco mesenquimais de tecido adiposo**

Para isolar o meio condicionado, as ASCs foram plaqueadas em garrafas de 75cm<sup>2</sup> e cultivadas em meio DMEM-low glicose suplementado com 10% de SFB e 1% penicilina/estreptomicina até 90% de confluência, após este período foi trocado o meio de cultura para DMEM- low glicose acrescido de 1% penicilina/estreptomicina sem SFB para condicionar o meio. As microvesículas e exossomos foram obtidos a partir do meio de cultura condicionado de ASC. O meio de cultura foi coletado após 48 horas e as MV e EX foram isolados de acordo com métodos estabelecidos por Théry *et al* [92] através de ultracentrifugação diferencial do sobrenadante a 4°C para separar as MV ou EX de acordo com o protocolo abaixo:

1. 300g por 10 minutos para remover células vivas
2. 600g por 10 minutos para remover células mortas
3. 2000g por 20 minutos para remoção de debris
4. 10.000g por 30 minutos para obter o pellet de **microvesículas**
5. 100.000g por 2 horas para obter o pellet de **exossomos**

As microvesículas e exossomos foram ressuspensos em PBS e se destinaram ao tratamento dos animais ou para dosagem e análise da concentração de proteínas

### **3.6 Análise da concentração e tamanho das microvesículas e exossomos**

As amostras MV e de EX foram ressuspensas em água milli-q filtrada e a análise foi realizada através de equipamento Nanosight NS300 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) com capacidade para detectar partículas em alta resolução em tempo real. As partículas são analisadas quanto a concentração e tamanho (partículas/mL). Todas as amostras foram diluídas dentro do limite de referência do equipamento ( $3 \times 10^8$  a  $9 \times 10^9$  partículas/mL). O NanoSight NS300 usa a tecnologia de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), sendo uma técnica exclusiva que utiliza as propriedades de espalhamento de luz e movimento browniano para obter a distribuição de tamanho e a contagem de partículas em suspensões. Um feixe de laser passa através do porta amostra e as partículas em suspensão no caminho desse feixe espalham a luz de modo que podem ser facilmente visualizadas através de um microscópio com 20x de aumento e uma câmera de vídeo acoplada. Na configuração específica da análise, três vídeos de 30s de duração foram gravados com uma velocidade de infusão constante (50 –unidade arbitrária). O limite de detecção foi fixado em 5 (unidade arbitrária) e pelo menos 1000 partículas foram analisados para cada amostra. O software processa o vídeo rastreando o movimento de todas as partículas em modo individual e simultâneo e pela equação de Stokes-Einstein que calcula o diâmetro hidrodinâmico.

### **3.7 Indução da diferenciação adipogênica, osteogênica e caracterização morfológica**

As ASCs foram diferenciadas em células das linhagens adipogênica e osteogênica. Para induzir a diferenciação, foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em cada poço de placa de cultura de 6 poços. Foram realizadas triplicatas para cada amostra (triplicatas técnicas) após confluência de 80% o meio de cultura convencional (DMEM baixa glicose + 10% SFB) foi substituído pelo meio adipogênico ou osteogênico (StemPro Adipogenesis Differentiation Kit e StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit, respectivamente - GIBCO, Invitrogen) durante 14-21 dias, com trocas regulares a cada 3 dias. A diferenciação foi confirmada com coloração específica de Oil red para adipócitos e Alizarina S para osteoblastos.

A diferenciação osteogênica foi demonstrada por acúmulo de cálcio na matriz extracelular por coloração de Alizarin Red nos dias 14 e 21 de diferenciação. As imagens foram fotografadas em microscópio invertido, com aumentos de 5X, 10X e 20X, registradas e a ossificação foi quantificada por remoção da coloração de Alizarin Red de cada uma das amostras, quantificação da absorbância da solução em espectrofotômetro (ab 450nm) e comparação com estes mesmos dados provenientes do controle negativo (células não diferenciadas, marcadas com Alizarin Red). Para a marcação de Alizarin red, as células foram lavadas com PBS, fixadas em álcool 70% por 30 minutos e marcadas com solução de Alizarin red 0,2% durante 30 min, as células foram lavadas em PBS deixando os poços secarem overnight. Após lavagem com água deionizada, a matriz extracelular rica em cálcio foi visualizada macroscopicamente com coloração avermelhada. Para medir a absorbância, a solução de Alizarin red foi retirada após lavagem em solução de 20% metanol + 10% ácido acético seguida de leitura no espectrofotômetro (abs 450nm). O processo de diferenciação adipogênica, foi confirmada por meio da coloração de Oil red 0,9%, diluído inicialmente em álcool isopropílico e depois acrescido de 3 partes de água deionizada. A solução filtrada foi adicionada à cultura de células previamente fixadas por 1 h com paraformaldeído 4%. A incubação foi de 5 min, em seguida as células foram lavadas com água deionizada e os vacúolos lipídicos foram visualizados com coloração alaranjada em microscópio invertido.

### **3.8 Citometria de Fluxo**

Depois de expandidas, as ASCs foram submetidas à caracterização imunofenotípica através de citometria de fluxo. Foram utilizados anticorpos primários conjugados com PE, FITC ou Cy3 específicos utilizando o seguinte painel de anticorpos: +CD73, +CD90, +CD29, +CD105, -CD31, -CD34, -CD45 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). A imunomarcação foi realizada na concentração de 1µg (anticorpo) /10<sup>6</sup> de células utilizando o citômetro FACSCanto (Beckton Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA) para a análise do dados. Para análise do tempo de retenção das MSC nos tecidos as ASCs foram incubadas com Qtracker 585 nm (Invitrogen, CA, USA) utilizando o método recomendado pelo fabricante. As células foram administradas seis semanas após a estenose, sendo estabelecidos quatro grupos conforme o

período após a administração das ASCs (24 horas, 48 horas, 72 horas e 15 dias). Animais que não receberam o tratamento foram utilizados como controle. Pedacos do rim direito e rim esquerdo foram macerados através de um filtro celular 70  $\mu\text{M}$  (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e as células foram lavadas duas vezes em PBS gelado seguida por análise de citometria de fluxo (FACSCanto; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

### **3.9 Administração de ASC, MV ou EX**

Após a caracterização, as ASCs foram administradas por via endovenosa (veia caudal) na densidade de  $2 \times 10^5$  células [93] diluídas em 200  $\mu\text{l}$  de PBS na 3ª semana e 5ª semana [15] após o clampeamento da artéria renal. Os grupos tratados com vesículas extracelulares receberam 100 $\mu\text{g}$  de MV ou EX [90, 91] diluídos em 200  $\mu\text{l}$  de PBS e administradas por via endovenosa.

### **3.10 Dosagens bioquímicas plasmáticas e urinárias**

As dosagens bioquímicas foram realizadas em analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus (Roche, Suíça), sendo utilizados Kits da Labtest Diagnóstica® para obter as concentrações de proteína (método de ensaio enzimático colorimétrico) e creatinina (método do picrato). As concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foram feitas através de um eletrodo íon seletivo (9180 Eletrolyte Analyzer, Roche Diagnostics, Indianapolis). Os valores do *clearance* de creatinina foram calculados pela fórmula  $UV/P$  (onde U = valores de creatinina urinária em mg/dL, V = volume urinário de 24 horas em mL/minutos e P = valores de creatinina plasmática em mg/dL).

### **3.11 Expressão Gênica**

A expressão de genes de interesse foi feita através da reação da enzima reversa transcriptase (RT) seguida de PCR quantitativo em tempo renal (RT-qPCR). Foram determinadas as expressões gênicas de marcadores de lesão renal, incluindo os marcadores de processos inflamatórios (TNF- $\alpha$ , interleucina-10 e interleucina-1 $\beta$ ), de processos pró-fibróticos (colágeno I e TGF $\beta$ ), do marcador de *homing* de células-

tronco (SDF-1 $\alpha$ ) e do marcador para análise de hipóxia celular através do fator indutor de hipóxia 1 alfa (HIF 1 $\alpha$ ) e  $\beta$ -actina como controle endógeno. Para tanto, a medula e o córtex renal foram armazenados no freezer -80°C.

O RNA total foi extraído do rim direito pelo método do fenol e isotiocianato de guanidina, utilizando o Trizol (Life Technologies, EUA). Em 100 mg de rim foi acrescentado 1 mL de reagente TRizol. O tecido foi então triturado no homogeneizador Precellys (BioAmerica, EUA), durante 45 segundos a 3341 g. Em seguida, foi adicionado clorofórmio (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) na proporção 0,2 mL de clorofórmio/1 mL de TRizol. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 13.362 g. O RNA contido na fase aquosa foi transferido para tubo Eppendorf® e foi precipitado por meio da adição de isopropanol (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) na proporção de 0,5 mL de isopropanol/1 mL de TRizol, seguida de centrifugação a 13.362 g por 10 minutos a 4°C. Depois o RNA foi lavado com etanol a 75% (1 mL de etanol/1mL de TRizol) e centrifugado a 10.231 g por 5 minutos a 4°C. O precipitado de RNA foi ressuspenso em 50  $\mu$ L de água bidestilada livre de RNAsases (Life Technologies, EUA).

A quantificação do RNA foi feita em um espectrofotômetro (NanoVue Plus, GE Health Care - EUA) e o resultado foi expresso em  $\mu$ g/ $\mu$ L. A qualidade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1%, que contém como agente desnaturante o formaldeído (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia).

A partir do RNA total, foi obtido o DNA complementar (cDNA). Em tubo Eppendorf®, contendo 2 $\mu$ g de RNA, foi adicionado 1 U de DNase (Promega Corporation, EUA) para eliminação de possível contaminação com DNA genômico. Em seguida, foi acrescentada uma solução contendo 0,1 M do detergente ditionitrol (DTT) (Life Technologies, EUA), 0,5 mg/mL do primer de politiminas (pDT) (Life Technologies, EUA), 10 mM de cada nucleotídeo (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia), adicionados na forma de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs). Por fim, foi adicionado 1 $\mu$ L da enzima transcriptase reversa (Life Technologies, EUA). A reação ocorreu durante 50 minutos a 42°C e depois durante 15 minutos a 95°C para interrupção da atividade da enzima. O cDNA obtido foi utilizado na reação de PCR para amplificar fragmentos específicos das moléculas estudadas. Os níveis de expressão do mRNA foram estimadas por PCR em tempo real (Quantstudio 7;

Applied Biosystems, Foster City, USA) utilizando os primers específicos para cada gene desenhados e construídos pela Sigma (Sigma Aldrich, EUA), conforme descrito na tabela 2.

**Tabela 2: Sequencia de Primers**

$\beta$ -actina	Forward: 5' CCTCTATGCCAACACAGTGC 3' Reverse: 5' ACATCTGCTGGAAGGTGGAC 3'
Interleucina (IL-10)	Forward: 5' GGTTTTCCAAGGAGTTGCTCC 3' Reverse: 5' ATTGAACCACCCGGCATCTGC 3'
Interleucina (IL-1 $\beta$ )	Forward: 5' TCTCAAGCAGAGCACAGACC 3' Reverse: 5' GACAAAGGCTTCCCCTGGAG 3'
Colágeno I (Col I)	Forward: 5'TCAGTCCCAAACGTCGAGGT 3' Reverse: 5' GCTGTGCAGGTGTTGAGCC3'
TGF- $\beta$	Forward: 5' TCAGTCCCAAACGTCGAGGT 3' Reverse: 5' GCTGTGCAGGTGTTGAGCC 3'
SDF-1 $\alpha$	Forward: 5'GAGCCATGTGCGCCAGAGCCAAC 3' Reverse: 5' CACACCTCTCACATCTTGAGCCTCT 3'
HIF-1 $\alpha$	Forward: 5'TGCTTGGTGCTGATTTGTGA 3' Reverse: 5'GGTCAGATGATCAGAGTCCA 3'

### 3.12 Quantificação de proteínas por *Western Blotting*

Para extração de proteínas, as amostras de tecido renal foram homogeneizadas (Homogenizer, Polytron, Switzerland) em solução RIPA (50mM Tris, 150mM NaCl, 1,0% nonidet P-40, 0,5% Deoxicolato de Sódio, 0,1% SDS), contendo inibidores de protease (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA). A concentração proteica total foi dosada através do kit BCA Protein Assay e a leitura realizada em espectrofotômetro a 520nm. Para a separação das proteínas, foram utilizados o gel de separação e o gel de alinhamento. Foram utilizados 50 $\mu$ g de proteína total e a eletroforese foi realizada com voltagem inicial de 80 volts e posteriormente 120 volts por aproximadamente uma hora e meia. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas durante 60 minutos para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA). A membrana contendo as proteínas foram lavadas com tampão TBS-T (10 mM Tris-HCl pH=7,5, 150 mM NaCl e 0,1% Tween 20) e armazenada no mesmo tampão até o uso.

Para a imunodeteção foram utilizados anticorpos específicos para MMP2 (Abcam, Cambridge, MA, USA) e CD63 (Abcam, Cambridge, MA, USA), todos os anticorpos foram diluídos em TBS-T contendo 3% de albumina de soro bovino (BSA).

A membrana de nitrocelulose contendo as proteínas foi bloqueada com 3% de BSA em TBS-T durante 2 horas. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário durante 2 horas seguidas pela incubação com o anticorpo primário por 12 horas. Os anticorpos foram utilizados nas seguintes concentrações: MMP2 (1:50) e CD63 (1:100) respectivamente.

Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T durante 10 minutos e em seguida foi incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase durante 1 hora. O anticorpo secundário anti-coelho (Sigma Aldrich, MO, EUA) foi diluído em TBS-T na concentração de 1:30.000. As membranas foram incubadas por 1 hora, posteriormente lavadas com TBS-T e incubadas com luminol (Immobilon Western Chemiluminescent HRP, Millipore Corporation, Billerica, EUA) por 30 segundos na ausência de luz. Logo após, as membranas foram transferidas para um sistema de foto documentação Luminescent Image Alliance 4.7 (Uvitec Cambridge, UK). O peso molecular das proteínas foi determinado por comparação com a migração das proteínas padrão Rainbow® (GE Healthcare, UK).

### **3.13 Análise dos resultados**

Os resultados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Dados foram analisados utilizando 1-way ANOVA seguido pelo pós-teste de *Tukey* ou *Newman Keuls*, quando apropriado. Os dados relativos à pressão arterial foram analisados através da 2-way ANOVA seguido pós-teste de *Bonferroni* pós-teste. A significância estatística foi definida como  $P < 0.05$ . Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

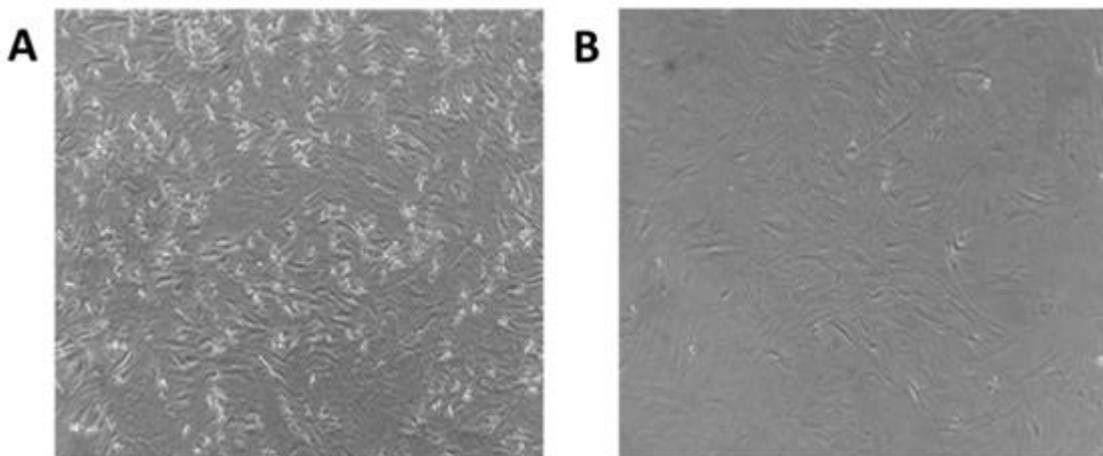
# RESULTADOS

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Cultivo e caracterização das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo

As ASCs apresentaram heterogeneidade celular durante os primeiros dias em cultura composta de células aderentes, não aderentes e moléculas lipídicas no meio de cultura (Figura 4 A). A partir do 4º dia de cultivo, a população celular apresentou maior homogeneidade, as células se organizaram em colônias e adquiriram a morfologia fibroblastóide demonstrando grande viabilidade das células aderentes (Figura 4 B) mantendo-se fenotipicamente estáveis em cultura.

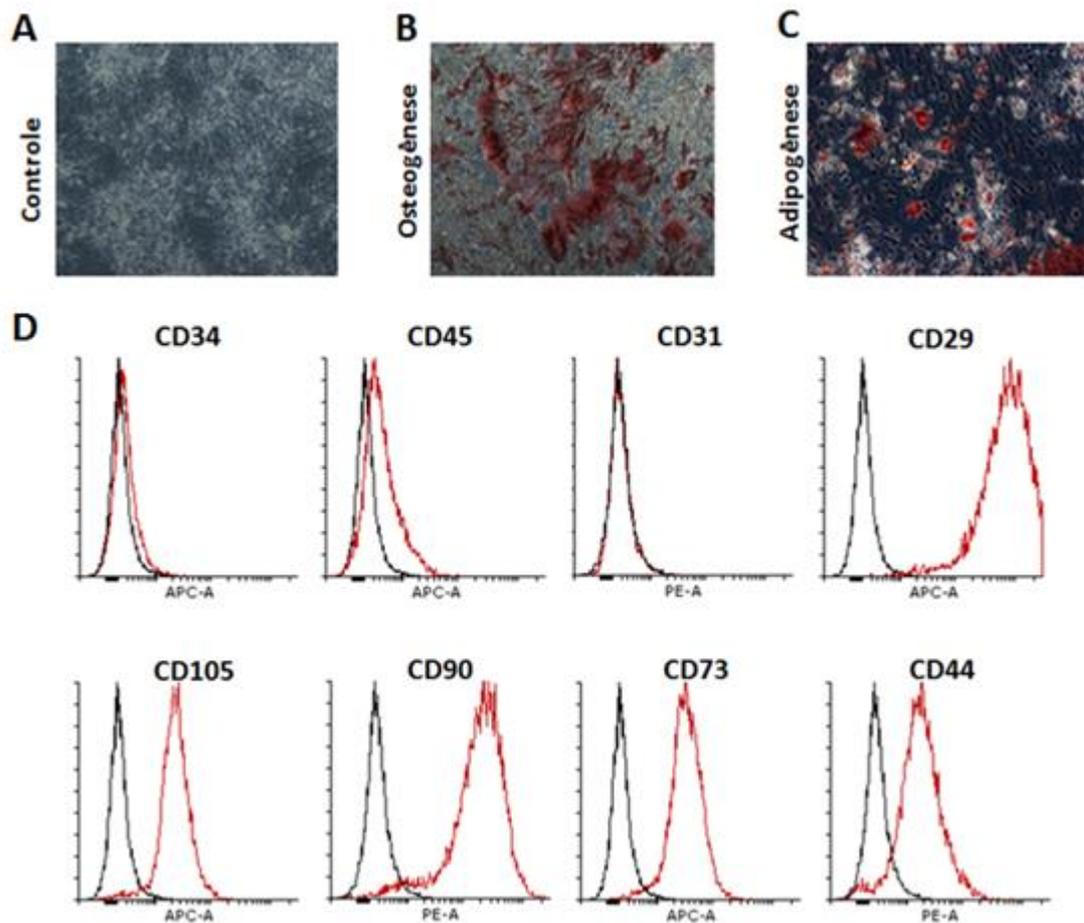


**Figura 4-** Cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. Imagens representativas de ASCs *in vitro*, passagem 0 (A) passagem 3 (B) (Aumento 100x).

Após a terceira passagem as ASCs foram caracterizadas em relação ao seu imunofenótipo e multipotencialidade. Para avaliar a multipotencialidade, as ASCs foram submetidas à diferenciação osteogênica e adipogênica. Para o controle as ASCs foram mantidas em meio padrão não sendo observado nenhum tipo de diferenciação (Figura 5A). As ASCs foram incubadas com o meio de diferenciação osteogênica por 21 dias e após este período submetidas ao protocolo de coloração com *Alizarin Red* o qual apresentou marcação dos depósitos de cálcio (Figura 5B).

Para avaliar a diferenciação adipogênica, as ASCs foram incubadas com o meio de diferenciação o qual apresentou mudança no seu fenótipo após 14 dias de

cultivo adquirindo formato e tamanho semelhante à adipócitos. Após a coloração de Oil Red as células com acúmulo citoplasmático de lipídeos apresentaram marcação vermelha como demonstrado na Figura 5C.



**Figura 5: Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo.** Foto representativa de uma cultura controle de células-tronco de tecido adiposo (ASCs) de rato Wistar (Aumento 5x) **(A)** Figura representativa de deposição de cálcio na matriz extracelular através da coloração de Alizarin Red S após 21 dias de diferenciação osteogênica (Aumento 5x) **(B)**. Figura representativa de góticulas lipídicas através da coloração de Oil Red após 14 dias de diferenciação adipogênica (Aumento 5x) **(C)** Caracterização do imunofenótipo das ASCs na terceira passagem **(D)**.

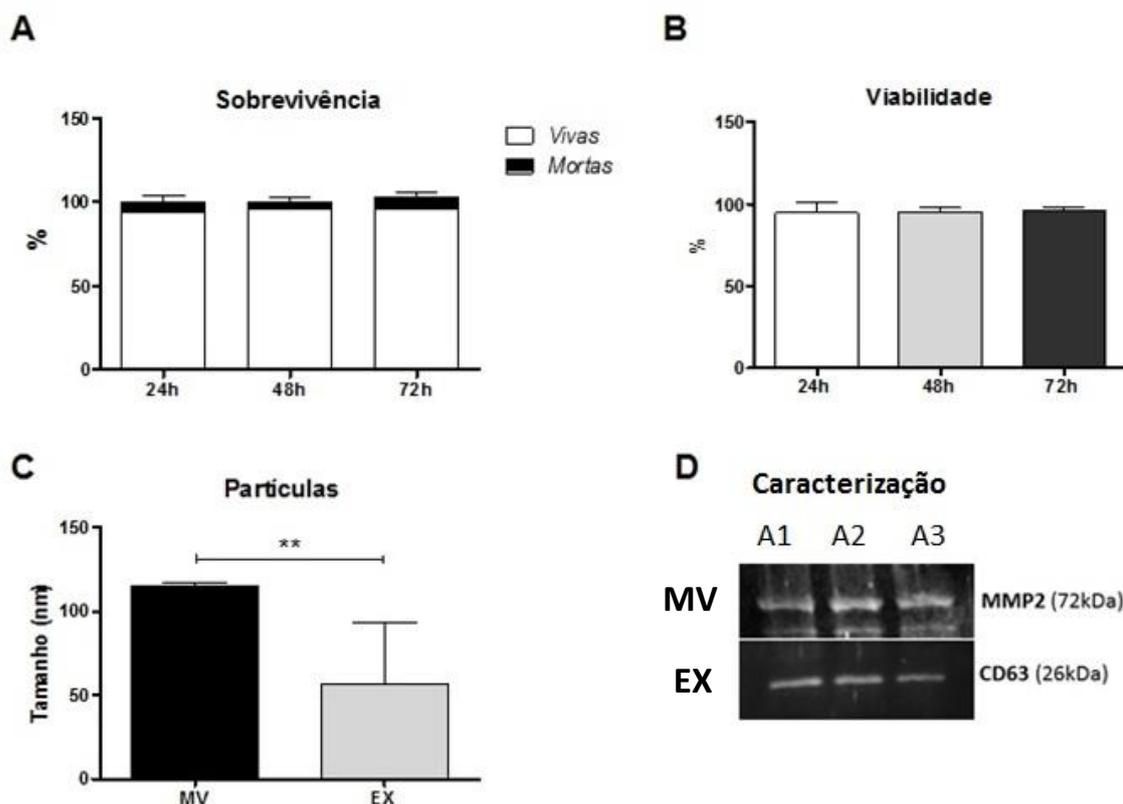
Após a terceira passagem as ASCs apresentaram um padrão negativo para os marcadores hematopoiéticos (CD 34, CD 45), endotelial (CD31), positiva para o marcador de adesão CD 29 e positivas para os marcadores mesenquimais (CD 105, CD90, CD73 e CD44) (Figura 5D).

## 4.2 Caracterização de microvesículas e exossomos derivados de ASC

As ASCs foram cultivadas sem a adição de SFB para obtenção do meio condicionado. Foram utilizados três tempos (24h, 48h e 72h) para análise de sobrevivência e viabilidade celular. Como demonstrado na Figura 6 A-B não houve diferença estatística na taxa de sobrevivência e viabilidade celular em 24h, 48h e 72h. Estes dados demonstram que o cultivo das ASC sem SFB não afeta na viabilidade celular e apoptose destas células em até 72h. Devido a maior porcentagem de vesículas extracelulares/mL de meio de cultura no período de 72h (dados não mostrados) optamos por escolher este período para retirada do meio condicionado e isolamento de vesículas extracelulares para tratamento dos animais.

A caracterização das vesículas extracelulares foi realizada primeiramente através da análise de concentração e tamanho de nanopartículas por *Nanosight*. As microvesículas apresentaram tamanho variável e maior ( $115\pm 1$  vs  $57\pm 36$ ;  $p < 0,05$ ) quando comparado aos exossomos (Figura 6C) demonstrando que as ASCs liberam vesículas extracelulares compatíveis em tamanho tanto com microvesículas quanto com exossomos.

As vesículas extracelulares foram analisadas em três replicatas biológicas independentes e submetidas à análise por *Western Blotting* utilizando os anticorpos MMP2, marcador para microvesículas e CD63, marcador para exossomos como demonstrado na (Figura 6D). Estes dados indicam que estas proteínas podem ser utilizadas para confirmar a presença e diferenciar microvesículas e exossomos derivados de ASC.

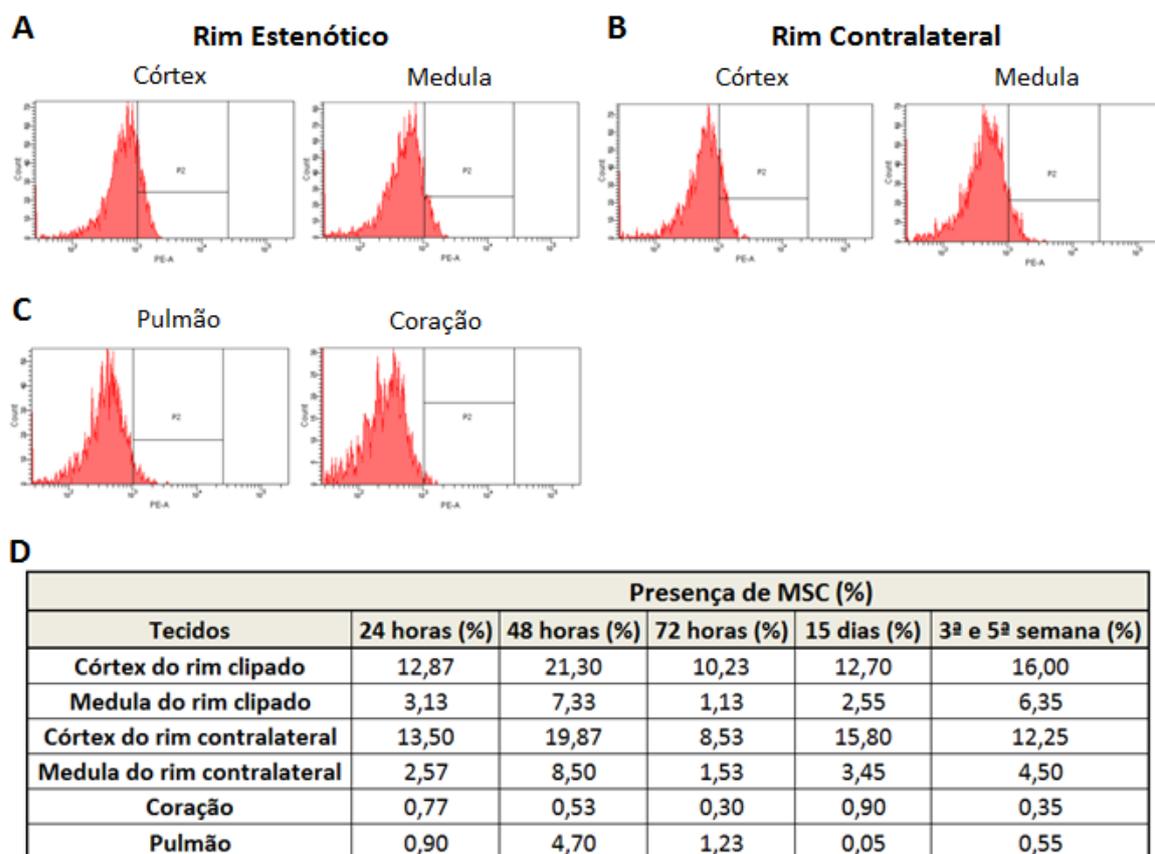


**Figura 6: Caracterização de microvesículas e exossomos derivados de ASC.** Análise de sobrevivência celular em diferentes tempos (A) viabilidade celular (B) tamanho de nanopartículas por *Nanosight* (C) caracterização de microvesículas e exossomos por *Western Blotting* (D) Dados demonstrados por media  $\pm$  DP.  $**p < 0.01$  vs. MV (One-way ANOVA seguido por Tukey's pós-teste, Teste T-Student).

### 4.3 Análises do tempo de retenção das ASCs nos tecidos

Para analisar o tempo de retenção das células-tronco nos tecidos, ASCs marcadas com *Qtracker* foram injetadas 6 semanas após a indução da estenose da artéria renal, sendo estabelecidos 4 grupos conforme o período após a administração das ASCs (24 horas, 48 horas, 72 horas e 15 dias) seguida por análise de citometria de fluxo (Figura 7). A maior porcentagem de células nos tecidos foi visualizada após 48 horas principalmente no rim esquerdo (28%) e rim direito (28%). Foram encontradas também no coração (0,5%) e pulmão (4%) e ao longo do tempo a presença das ASCs diminuiu consideravelmente nos pulmões (0,05%) enquanto que a porcentagem de células se manteve elevada no rim

esquerdo (15%) e direito (19%) mesmo após 15 dias da administração. Outros grupos de animais receberam 2 doses de ASCs na 3ª e 5ª semana após o clampeamento. Estes grupos também apresentaram retenção destas células no rim direito 16% e rim esquerdo 22%.

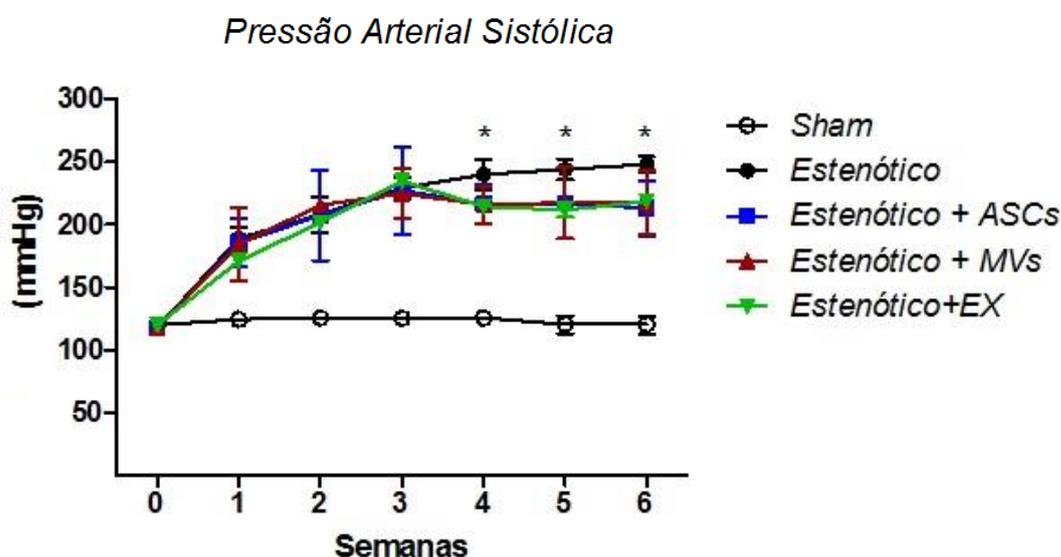


**Figura 7: Administração e localização de ASC marcadas com QTracker® por via endovenosa em diferentes tempos.** Imagens representativas de ASC coradas com marcador fluorescente detectada por citometria de fluxo nos animais estenóticos no córtex e medula do rim estenótico **(A)** córtex e medula do rim contralateral **(B)**, pulmão e coração **(C)**. Porcentagem de células marcadas no córtex e medula do rim estenótico e contralateral, pulmão e coração analisadas por citômetro de fluxo **(D)**.

#### 4.4 Estenose crônica da artéria renal e análise da PAS

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida semanalmente em animais estenóticos (após a oclusão da artéria renal) ou em animais Sham (sem oclusão da artéria renal) por plestimografia. O procedimento foi realizado em triplicatas biológicas e a média dos valores foi analisada durante 6 semanas.

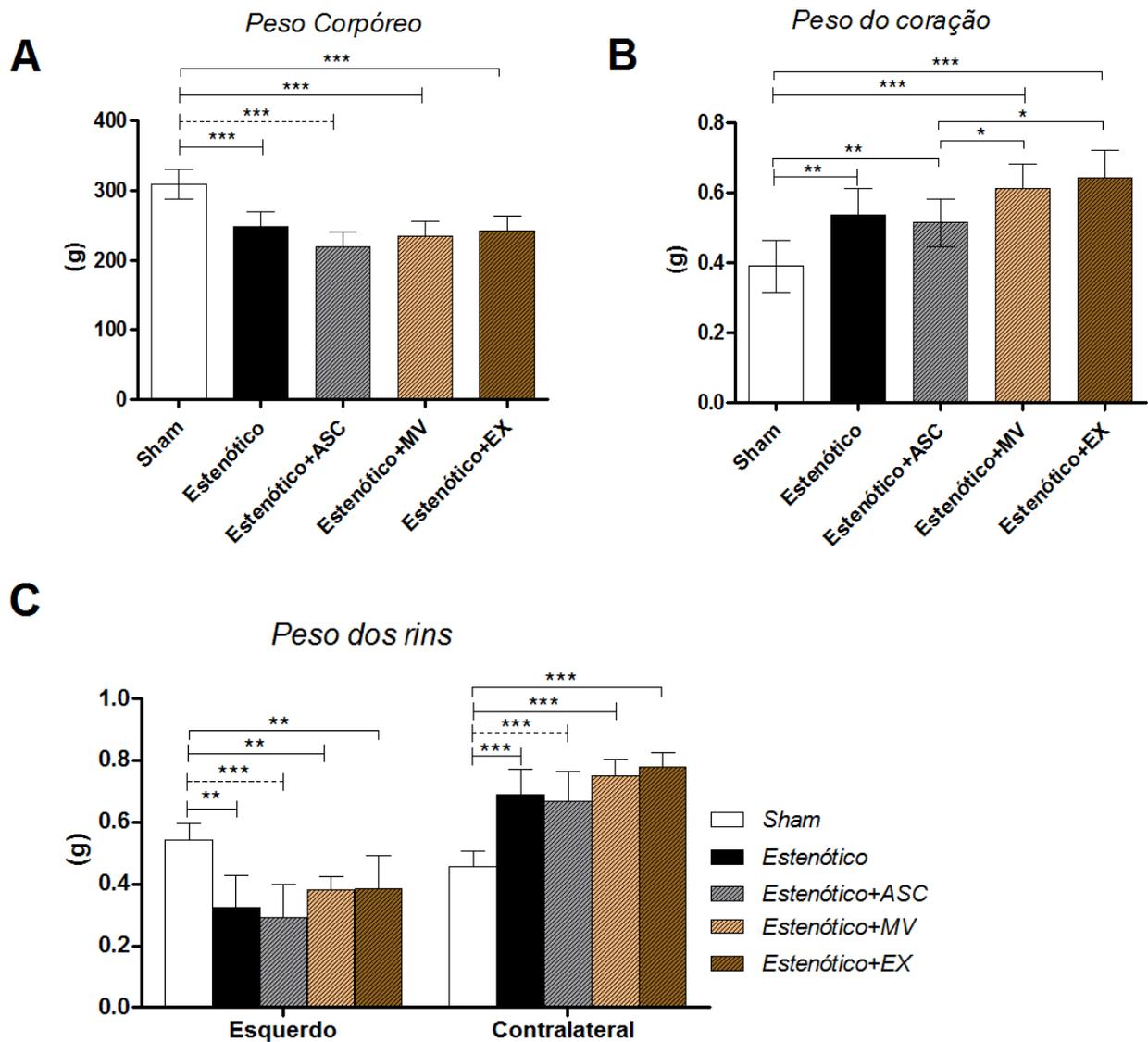
Como observado na Figura 8 os valores basais da PAS foram semelhantes entre os grupos, demonstrando que os animais utilizados nos experimentos apresentam as mesmas condições antes do procedimento. Após o clampeamento da artéria renal os animais estenóticos apresentaram aumento progressivo da PAS enquanto que o grupo tratado com ASC, MV e EX evidenciaram uma discreta redução da PAS após a terceira semana, porém houve estabilização na quarta semana sem aumentos adicionais até a sexta semana.



**Figura 8: Pressão arterial sistólica.** Valores registrados por plestimografia durante seis semanas no grupo controle (n=10), Estenótico (n=7), Estenótico + ASCs (n=7), Estenótico+MV (n=7) e Estenótico+EX (n=7). PAS demonstrada por média  $\pm$  DP. \* $p < 0.05$  (2-way ANOVA seguido pós-teste de Bonferroni).

#### 4.5 Análise do peso corpóreo, dos rins e do coração

Os animais hipertensos apresentaram menor ganho de peso corpóreo (PC) comparado ao grupo Sham ( $239 \pm 9$  vs  $309 \pm 21$ g;  $p < 0.001$ ). A evolução do PC não foi modificada por nenhum dos tratamentos (Figura 9A).



**Figura 9:** Valores de peso corpóreo **(A)** peso do coração **(B)** peso dos rins **(C)** nos grupos controle (n=7), Estenótico (n=7), Estenótico + ASCs (n=7), Estenótico+MV (n=7) e Estenótico+EX (n=7). Dados demonstrados por media  $\pm$  DP. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (1-way ANOVA seguido pós-teste de Newman-Keuls).

Os animais estenóticos apresentaram aumento significativo dos valores de peso do coração quando comparado ao grupo Sham ( $0,54\pm 0,07\text{g}$  vs  $0,39\pm 0,07\text{g}$ ;  $p<0.05$ ), entretanto os tratamentos com ASC, MV e EX não induziram mudanças significativas nos valores de peso do coração quando comparados ao grupo Sham (Figura 9B).

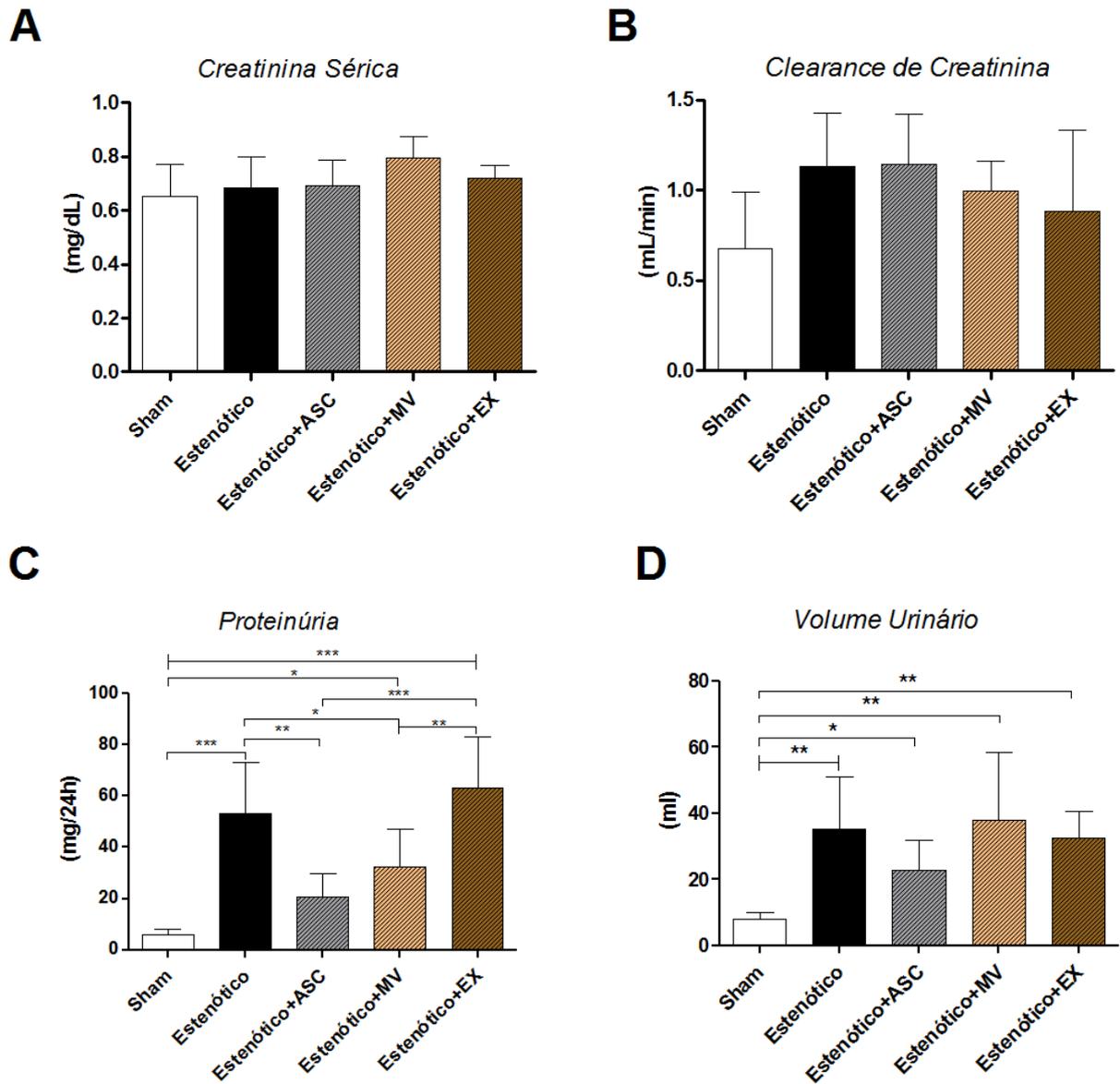
Houve uma redução dos valores de peso do rim estenótico quando comparado ao grupo Sham ( $0,37\pm 0,08\text{g}$  vs  $0,53\pm 0,05\text{g}$ ;  $p<0.05$ ) e esses valores não foram revertidos pelos tratamentos (Figura 9C). Por outro lado, o peso do rim contralateral dos animais estenóticos foi significativamente maior comparado com o controle ( $0,70\pm 0,08\text{g}$  vs  $0,44\pm 0,05\text{g}$ ;  $p<0.001$ ). Os tratamentos não induziram mudanças significativas quando comparados ao grupo Sham (Figura 9C).

#### 4.6 Parâmetros de função renal

Não foram detectadas alterações nas concentrações séricas de creatinina entre os grupos (Figura 10A) e a estimativa da TFG através do *clearance* de creatinina não apresentou mudanças significantes (Figura 10B).

O grupo estenótico apresentou proteinúria significativa quando comparado ao grupo Sham. O tratamento com ASCs resultou em redução significativa na proteinúria quando comparado ao grupo estenótico não tratado ( $20\pm 9$  vs  $53\pm 20$  mg/24 h;  $p<0,01$ ). O tratamento com MV também melhorou a proteinúria quando comparado ao grupo estenótico ( $32\pm 15$  vs  $53\pm 20$  mg/24h;  $p<0.05$ ), porém com menor eficiência estatística quando comparado ao grupo tratado com ASCs. O grupo tratado com EX não apresentou melhora significativa da proteinúria. Estes resultados sugerem que as ASCs e MV foram mais eficientes na proteção glomerular comparado ao grupo tratado com EX (Figura 10C).

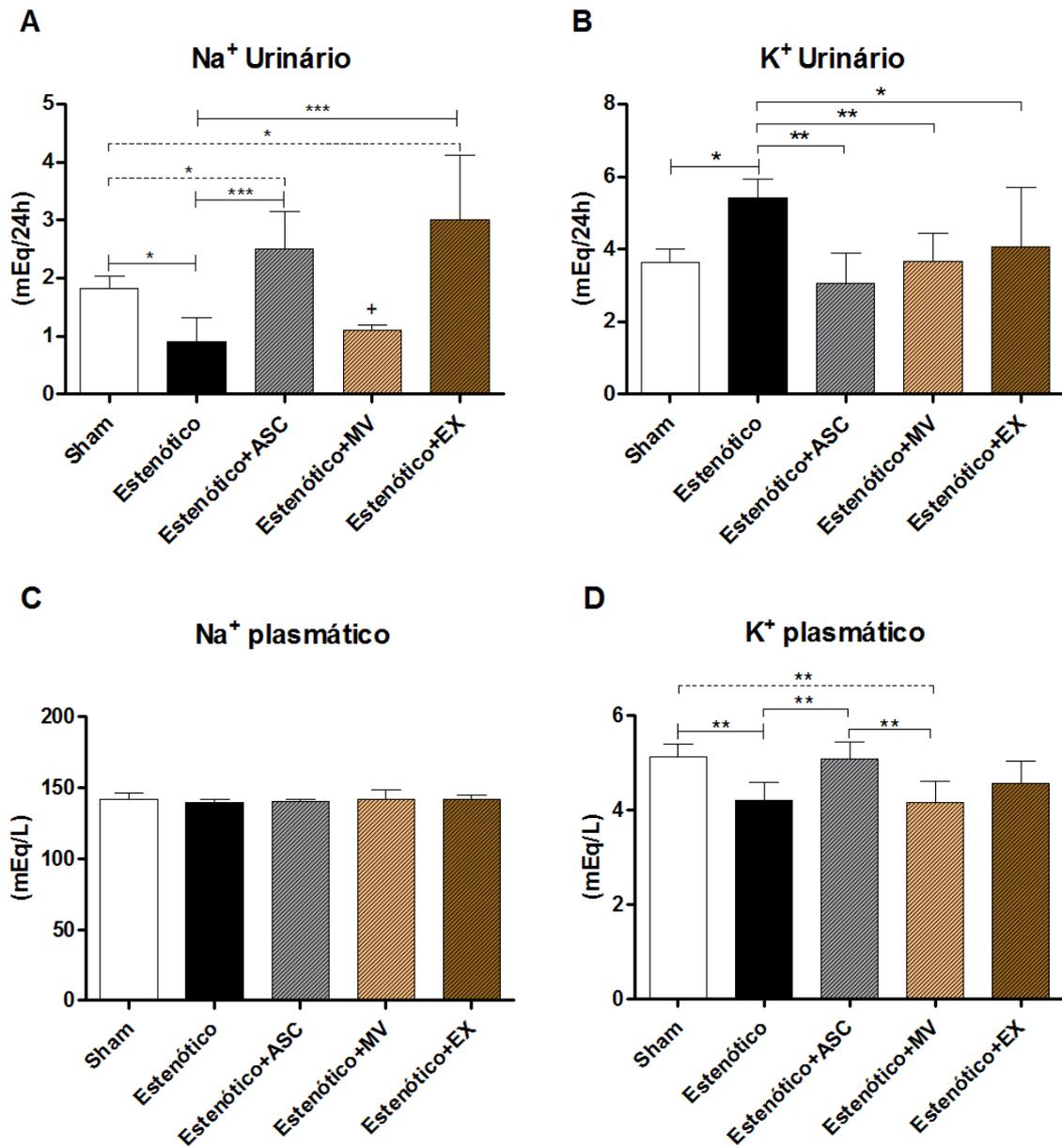
O grupo estenótico apresentou aumento significativo do volume urinário de 24 horas quando comparado com o grupo Sham e os tratamentos com ASCs, MV e EX não alteraram este parâmetro (Figura 10D).



**Figura 10: Parâmetros de função renal.** Creatinina sérica (A); *clearance* de creatinina (CICr) (B); proteinúria (C); volume urinário (D). Grupos Sham (n=7), Estenótico (n=7), Estenótico + ASCs (n=7), Estenótico + MV (n=7) e Estenótico + EX (n=7). Dados demonstrados por média ± desvio padrão. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (1-way ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls).

Seis semanas após cirurgia os animais estenóticos apresentaram redução na carga excretada de  $\text{Na}^+$  comparado a grupo Sham ( $0,9 \pm 0,4$  vs  $1,8 \pm 0,2$  mEq/24h;  $p < 0,05$ ). As ASCs foram capazes de elevar a excreção urinária de  $\text{Na}^+$  para níveis acima dos observados para o grupo Sham ( $2,5 \pm 0,7$  vs  $1,8 \pm 0,2$  mEq/24h;  $p < 0,05$ ). Este efeito natriurético também foi obtido pelo tratamento com os EX ( $3,0 \pm 1,1$  vs  $0,9 \pm 0,4$  mEq/24h;  $p < 0,001$ ) comparado ao grupo estenótico mas, não com as MV o qual apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo tratado com ASC ( $1,1 \pm 0,1$  vs  $2,5 \pm 0,7$  mEq/24h;  $p < 0,01$ ) e o grupo tratado com EX ( $1,1 \pm 0,1$  vs  $3 \pm 1,1$  mEq/24h;  $p < 0,001$ ) atingindo valores próximos ao grupo estenótico (Figura 11A). Essas variações nas taxas de excreção de sódio, no entanto, não produziram modificações nas concentrações plasmáticas de sódio (Figura 11C).

Os animais estenóticos apresentaram aumento na excreção urinária de  $\text{K}^+$  comparado ao grupo Sham ( $5,4 \pm 0,5$  vs  $3,6 \pm 0,4$  mEq/24h;  $p < 0,05$ ) resultando em redução na concentração plasmática de  $\text{K}^+$  ( $4,2 \pm 0,4$  vs  $5,1 \pm 0,3$  mEq/24h;  $p < 0,01$ ). Os tratamentos com ASC, MV e EX foram eficientes em diminuir a excreção de  $\text{K}^+$  entretanto, somente o grupo tratado com ASC foi eficiente em restaurar as concentrações plasmáticas deste íon atingindo valores próximos ao grupo Sham (Figuras 11B e 11D).



**Figura 11: Balanço eletrolítico.** Sódio urinário (A); potássio urinário (B); sódio plasmático (C); potássio plasmático (D). Grupos Sham (n=6), Estenótico (n=6), Estenótico + ASCs (n=6), Estenótico + MV (n=6) e Estenótico + EX (n=6). Dados demonstrados por média ± desvio padrão. \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , +  $p < 0.001$  (1-way ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls).

#### 4.7 Expressão gênica dos marcadores de interesse

Os animais hipertensos apresentaram um aumento da expressão de colágeno tipo I tanto no córtex quanto na medula do rim esquerdo (clipado). Esse aumento foi reduzido nos animais tratados com ASCs, MV e EX (Figuras 12A e 12C). Observamos também um aumento da expressão do Col I no córtex do rim contralateral, os animais tratados com ASC, MV e EX apresentaram redução significativa deste parâmetro. A medula do rim contralateral também apresentou um aumento de expressão de colágeno tipo I o qual apresentou redução significativa com o tratamento utilizando ASC, MV e EX (Figura 12B e 12D).

Similar à expressão de colágeno, a expressão gênica do TGF- $\beta$  foi aumentada no córtex e medula tanto no rim esquerdo (estenótico) como no contralateral em comparação com o grupo Sham (Figura 13 A-D). Os tratamentos com ASCs, MV e EX foram eficientes em reduzir a expressão do TGF- $\beta$  no rim estenótico (Figura 13A e 13C) e no córtex do rim contralateral (Figura 13B e 13D). Porém essa eficiência foi menor na medula do rim contralateral nos animais tratados com ASC.

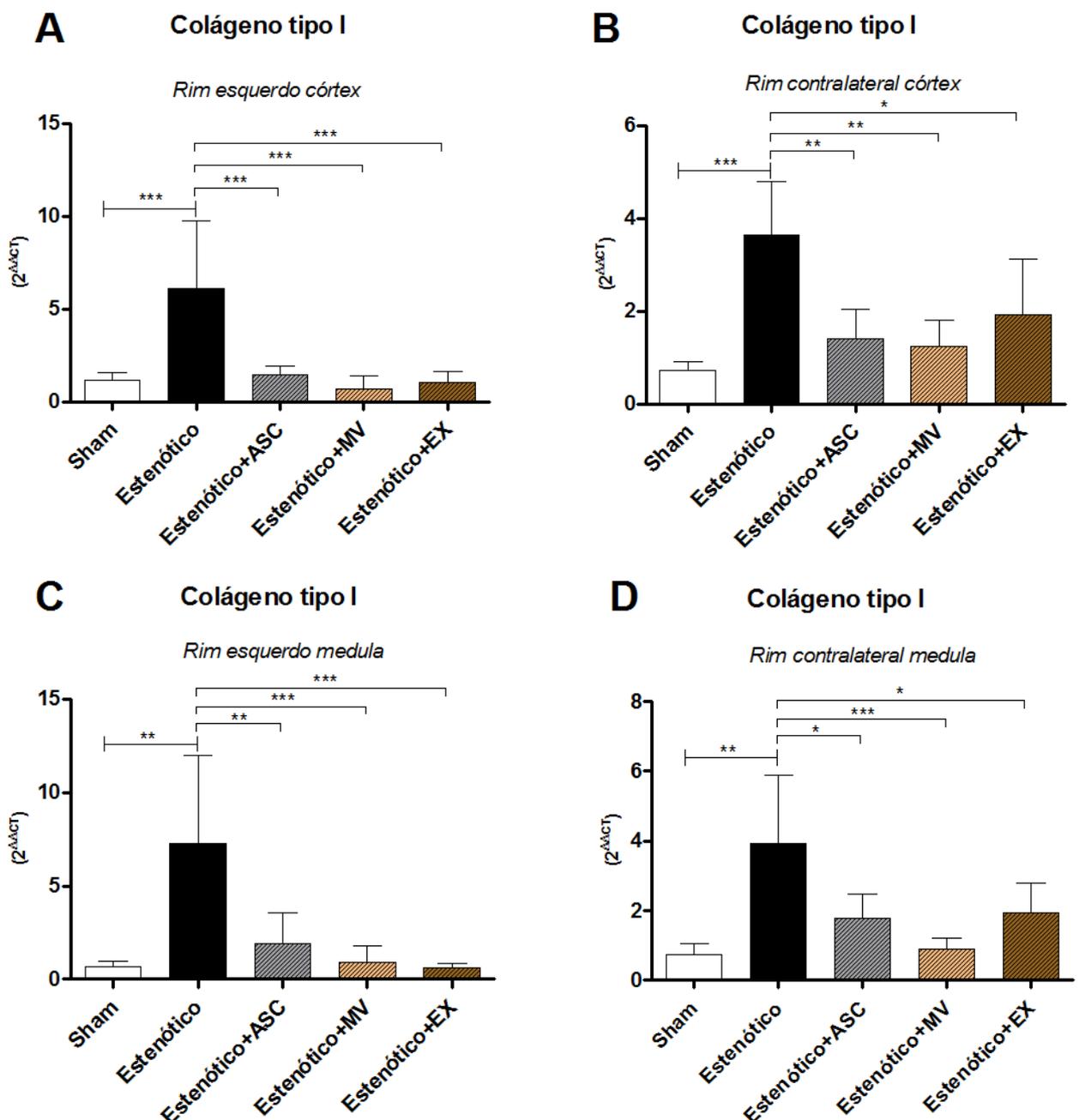


Figura 12: Expressão de mRNA de colágeno tipo I estimados por RT-PCR quantitativo. Rim estenótico córtex (A); rim contralateral córtex (B); rim estenótico medula (C); rim contralateral medula (D). Grupos Sham (n=6), Estenótico (n=6), Estenótico+ASC (n=6), Estenótico+MV e Estenótico+EX (n=6) \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001 (One-way ANOVA seguido por Tukey's pós-teste).

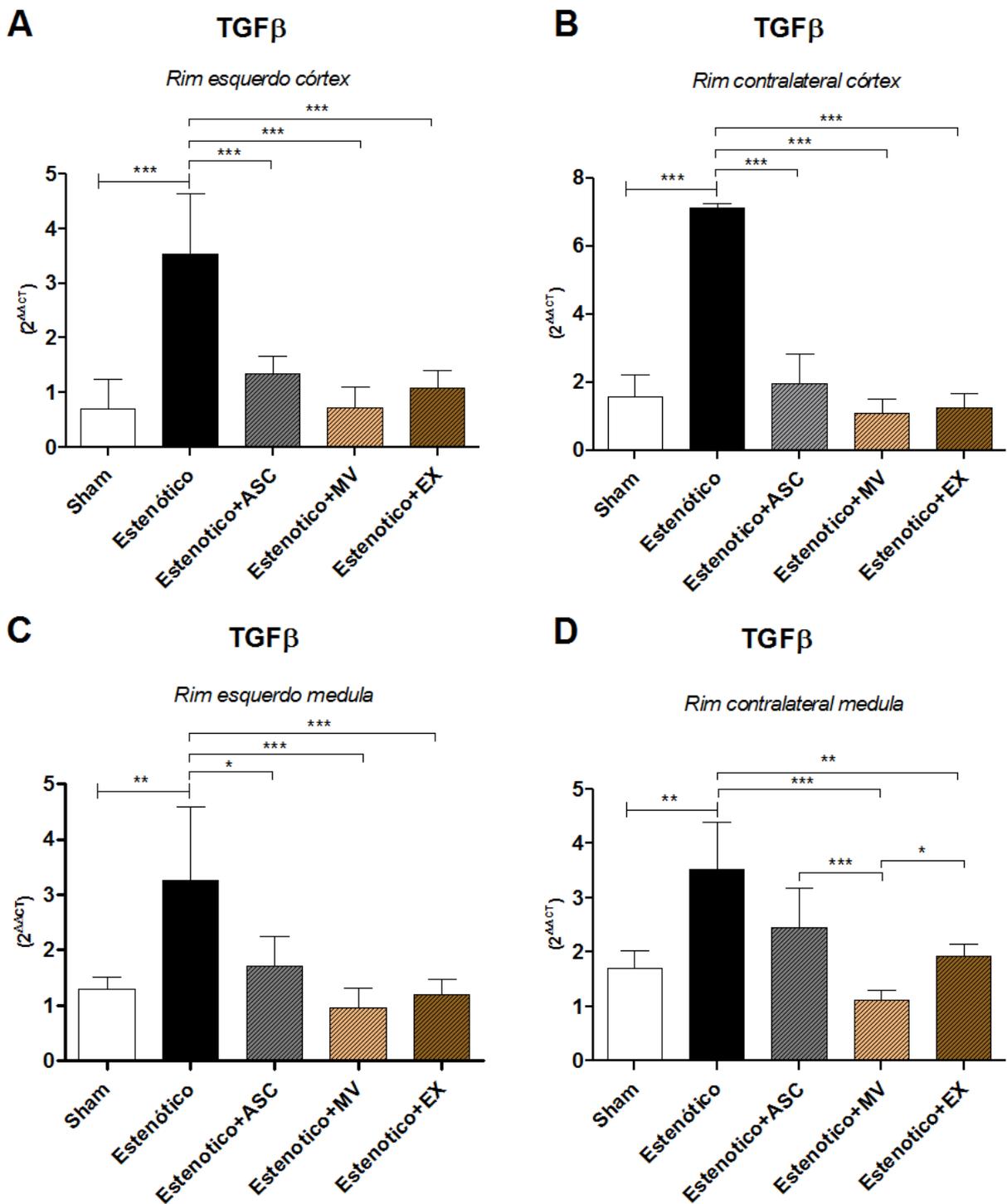
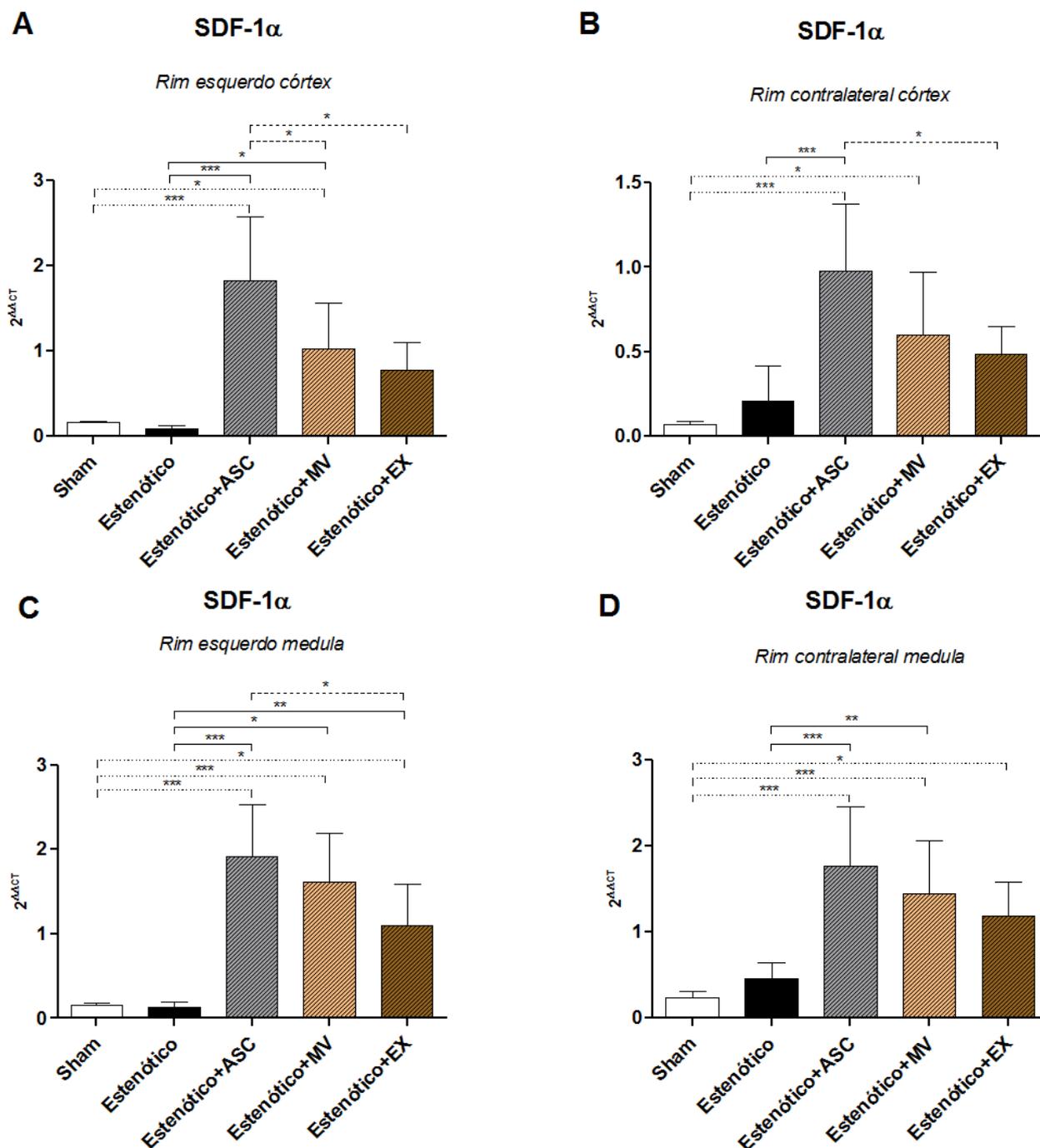


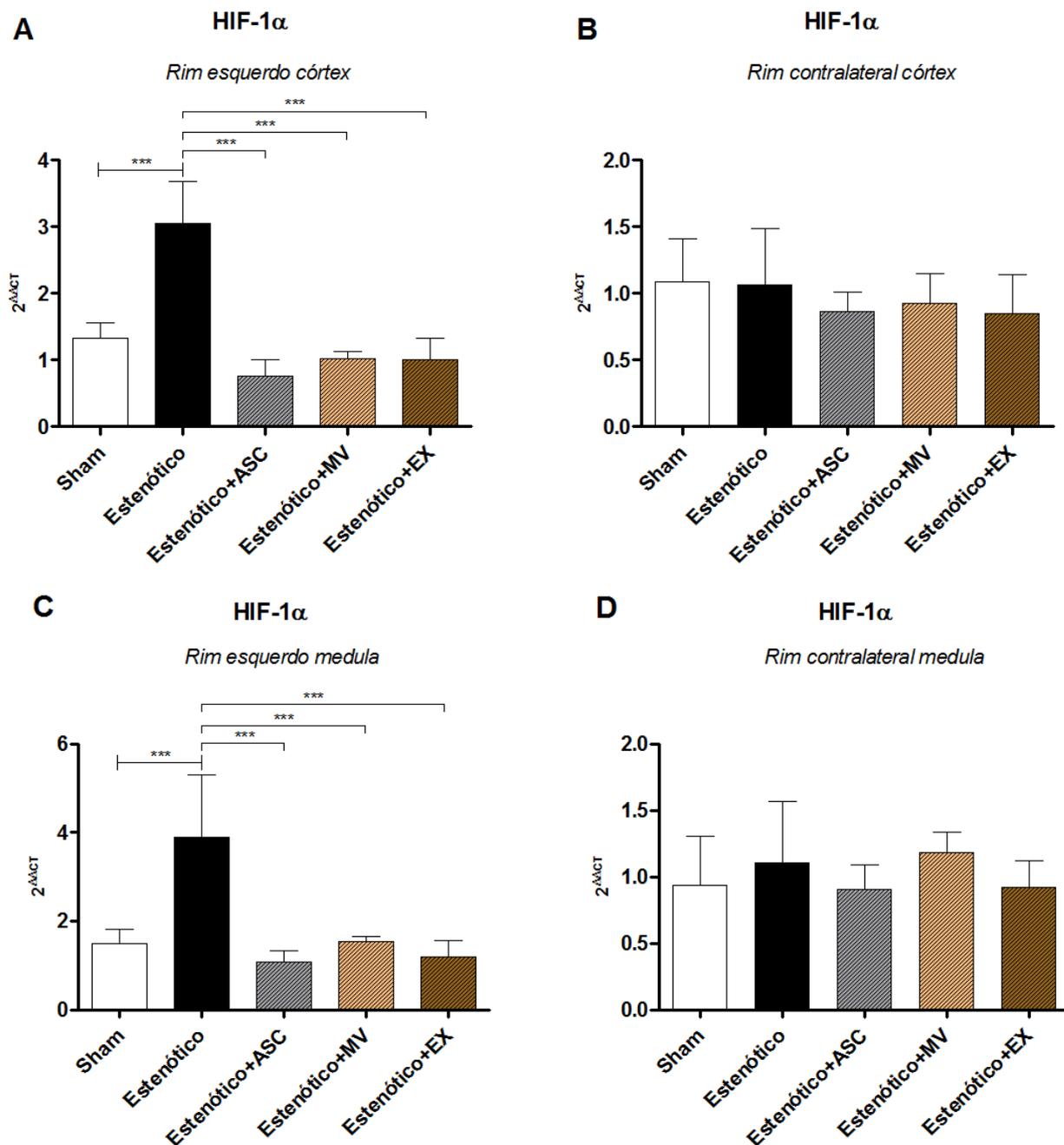
Figura 13: Expressão de mRNA de TGFβ estimados por RT-PCR quantitativo. Córtex do rim estenótico (A); córtex do rim contralateral (B); medula do rim estenótico (C); medula do rim contralateral (D). Grupos Sham (n=5), Estenótico (n=5), Estenótico+ASC (n=5) \* p<0.05 vs Estenótico (One-way ANOVA seguido por Tukey's pós-teste).

Os animais tratados com ASC apresentaram um aumento significativo na expressão do marcador de *homing* de células-tronco SDF1- $\alpha$  no córtex e medula tanto no rim estenótico quanto no rim contralateral (Figura 14). Interessante que os grupos tratados com MV e EX também apresentaram aumento, embora menor, na expressão de SDF1- $\alpha$  em ambos os rins (Figura 14 A-D), sugerindo que esta proteína pode ser transportada via vesículas extracelulares.

Como esperado, a expressão do marcador de hipóxia HIF1- $\alpha$  foi aumentada no córtex e medula do rim estenótico (Figura 15A e 15C), mas não no rim contralateral (Figura 15 A-D). Os tratamentos com ASC, MV e EX foram eficientes em reduzir este marcador atingindo valores similares ao grupo Sham (Figura 15 A-C).



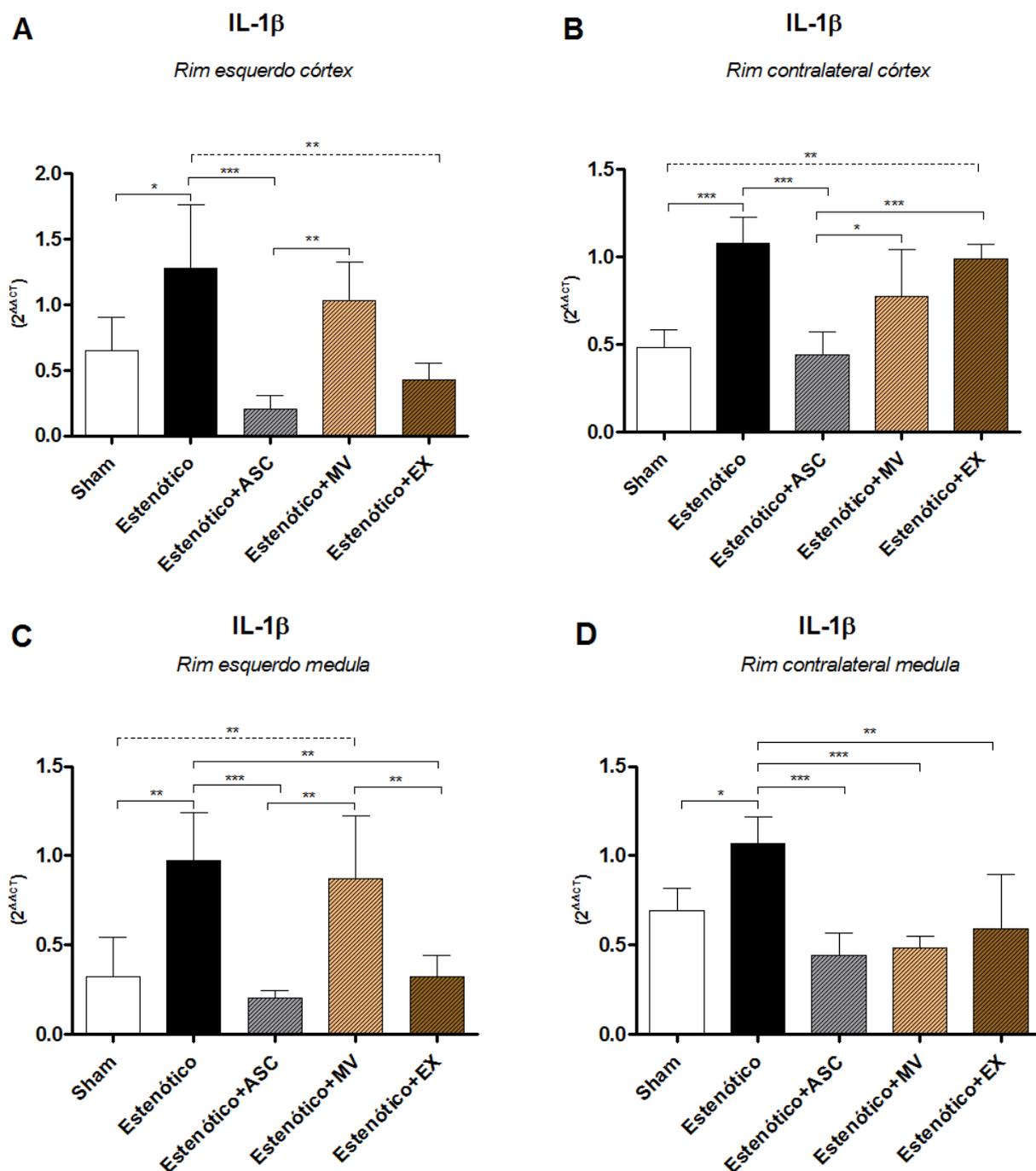
**Figura 14: Expressão de mRNA de SDF1- $\alpha$  estimados por RT-PCR quantitativo.** Rim estenótico córtex (A); rim contralateral córtex(B) rim estenótico medula (C); rim contralateral medula (D). Grupos Sham (n=6), Estenótico (n=6), Estenótico+ASC (n=6), Estenótico+MV (n=6), Estenótico+EX (n=6) \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001 (One-way ANOVA seguido por Tukey's pós-teste).



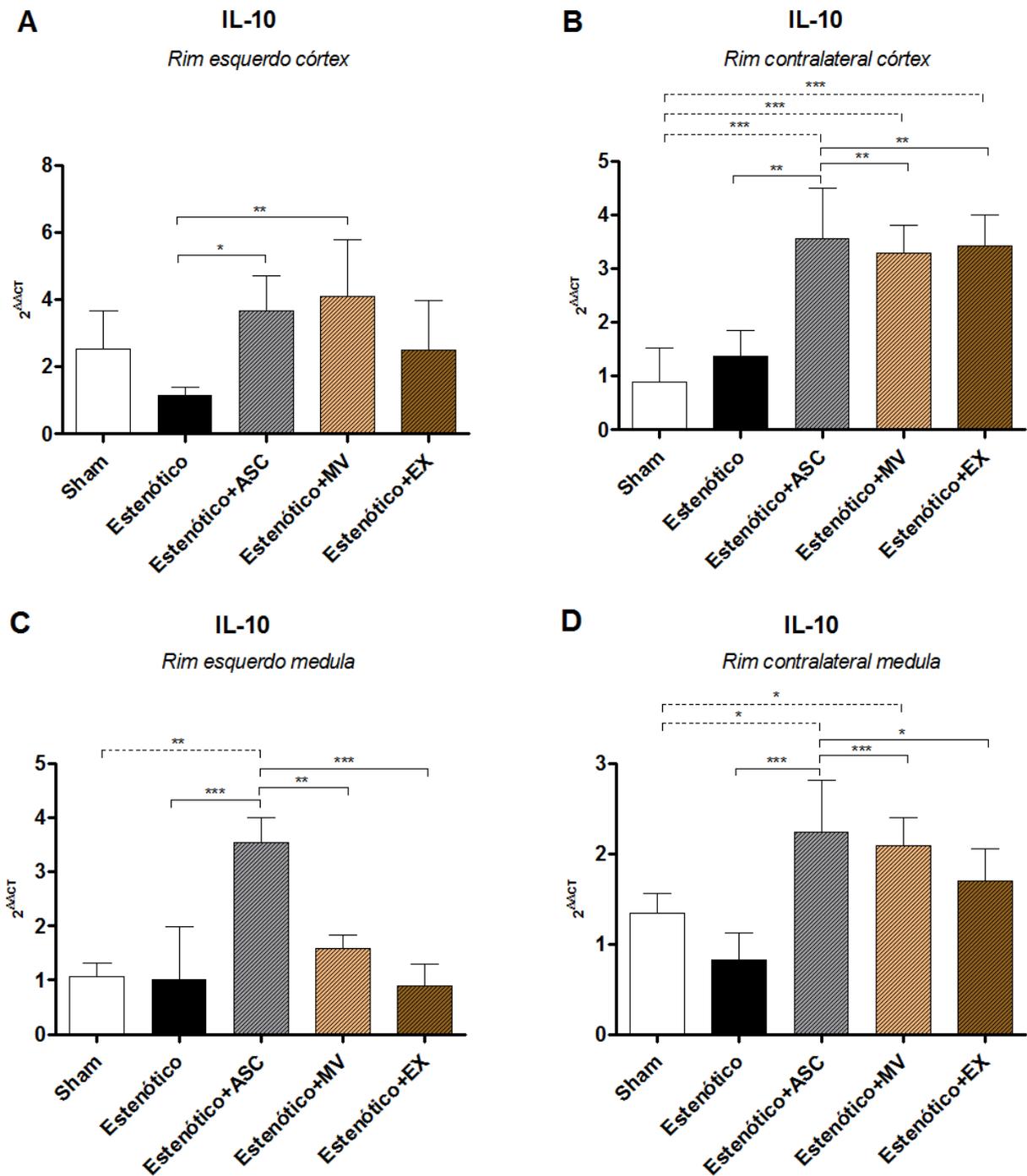
**Figura 15: Expressão de mRNA de HIF1-α estimados por RT-PCR quantitativo.** Rim estenótico córtex (A) rim estenótico medula (B); rim contralateral córtex (C); rim contralateral medula (D). Dados dos grupos Sham (n=6), Estenótico (n=6), Estenótico +ASC (n=6), Estenótico +MV (n=6), Estenótico+EX (n=6). \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001 (One-way ANOVA seguido por Tukey's pós-teste).

Houve um aumento de expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  em ambos os rins dos animais hipertensos tanto no córtex quanto na medula quando comparado ao Sham (Figura 16). A expressão de IL-1 $\beta$  foi eficientemente reduzida nos dois rins principalmente pelo grupo tratado com ASC. No rim estenótico, o tratamento com EX, mas não com MV, resultou em melhora neste parâmetro (Figura 16A e 16C). Os tratamentos com MV e EX induziram melhora consistente apenas na medula do rim contralateral (Figuras 16C e 16D).

A indução de estenose da artéria renal não modificou a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 em nenhum dos rins (Figura 17 A-D). Apesar disto, o tratamento com ASC foi eficiente em aumentar os níveis de expressão de IL-10 em ambos os rins (Figura 17 A-D). Os animais tratados com MV também apresentaram aumento de IL-10 no córtex do rim estenótico (Figura 17 A) e córtex e medula do rim contralateral (Figura 17B-C). Já os animais tratados com EX somente foram eficientes em aumentar este parâmetro no córtex do rim contralateral (Figura 17B).



**Figura 16: Expressão de mRNA de IL-1 $\beta$  estimado por RT-PCR quantitativo.** Rim estenótico córtex (A); rim contralateral córtex (B); rim esquerdo medula (C); rim contralateral medula (D). Grupos Sham (n=5), Estenótico (n=5), Estenótico +ASC (n=5), Estenótico +MV (n=5), Estenótico +EX (n=5) \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001 (One-way ANOVA seguido por Tukey's pós-teste).



**Figura 17: Expressão de mRNA de IL-10 estimado por RT-PCR quantitativo.** rim estenótico córtex (A); rim contralateral córtex (B); rim esquerdo medula (C); rim contralateral medula (D). Grupos Sham (n=5), Estenótico (n=5), Estenótico +ASC (n=5), Estenótico +MV (n=5), Estenótico+EX (n=5). \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001 (One-way ANOVA seguido por Tukey's pós-teste).

# DISCUSSÃO

---

## 5. DISCUSSÃO

A estenose crônica da artéria renal promove redução do fluxo sanguíneo resultando na ativação do SRA o que contribui para a instalação da hipertensão renovascular. Além disto, a hipóxia crônica resulta em injúria do tecido renal caracterizada por rarefação vascular, inflamação e fibrose. Comprovamos, após o procedimento, que nosso modelo em ratos induziu a hipertensão renovascular e provocou efeitos renais semelhantes a aqueles demonstrados em trabalhos anteriores [15, 94, 95]. Os efeitos benéficos de células-tronco mesenquimais de medula óssea e células progenitoras endoteliais na melhora do parênquima renal e da função renal em modelos animais de hipertensão renovascular já foram previamente mostrados [15, 53, 96]. Neste estudo avaliamos e comparamos a eficácia de células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASC) e de suas vesículas extracelulares (VE) na minimização dos efeitos da isquemia crônica no rim estenótico bem como no rim contralateral sujeito aos efeitos da hipertensão arterial severa.

Um atrativo no uso de células-tronco provenientes de tecido adiposo inclui a relativa facilidade de obtenção e maior taxa de proliferação *in vitro* quando comparada às células-tronco derivadas de medula óssea [35, 68, 97]. As MSC de diversas origens têm sido aplicadas em diversos estudos clínicos e os efeitos benéficos observados parecem ser mediados por suas VE, as quais mimetizam os efeitos terapêuticos de MSC [98]. Há evidências de que as VE atuam como mediadores da atividade parácrina das MSC e possuem atividades imunomodulatórias inibindo processos inflamatórios, promovendo efeitos regenerativos semelhantes às MSC e já foram testadas em diversos estudos pré-clínicos como, por exemplo, no tratamento de injúria renal aguda, doenças cardiovasculares e neurológicas [99-101].

A utilização de VE tem algumas vantagens na terapia clínica quando comparadas às MSC. Ao contrário das células-tronco, as VE não possuem a capacidade de auto-replicação diminuindo, portanto, os riscos de uma possível formação tumoral [102]. Além disto, é importante considerar que as VE possuem meia-vida curta e não permanecem de forma contínua no organismo [98] diminuindo assim complicações futuras como por exemplo a trombose e obstrução de capilares [103], manifestações frequentemente observadas após transplante celular.

Finalmente, as VE possuem menor possibilidade de rejeição imunológica devido ao seu pequeno tamanho e menor expressão de moléculas ligadas à membrana, incluindo moléculas de histocompatibilidade [104, 105] e podem atuar também reduzindo a resposta de citocinas pró-inflamatórias no caso de transplante alogênico de células hematopoiéticas em pacientes com doenças hematológicas [103]. Assim, considerando-se todas essas vantagens, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a eficácia das vesículas extracelulares no tratamento da HR e da hipóxia renal crônica comparada às ASCs.

Inicialmente foram avaliados os tipos de vesículas secretadas pelas ASCs sendo constatada a presença de vesículas, no meio de cultura, compatíveis em tamanho tanto com exossomos (EX) quanto com microvesículas (MV), salientando que, além do tamanho, a principal diferença entre essas estruturas relaciona-se à sua biogênese, sendo os EX sintetizados a partir de corpos multivesiculares intracelulares e as MV através de brotamentos da membrana citoplasmática. Este aspecto é relevante, pois essas microvesículas podem conter diferentes cargas moleculares.

No presente estudo demonstramos que a maior porcentagem de ASCs ficou retida no rim estenótico nas primeiras 72h, porém, após o período de 15 dias as células foram identificadas no rim estenótico e também no rim contralateral e este fato pode ser justificado pela capacidade de *homing* das células-tronco que migraram para o tecido lesionado. Entre as diversas quimiocinas envolvidas no *homing* de células tronco destaca-se o fator derivado de células estromais (SDF-1 $\alpha$ ) [106, 107]. Esta molécula está envolvida em múltiplos processos como regulação da migração e sobrevivência celular em diversos tipos de células [106, 108-110]. Embora a expressão de SDF-1 $\alpha$  não tenha sido alterada no rim isquêmico e nem no rim hipertenso, o tratamento com ASCs foi acompanhado por um aumento significativo na expressão de SDF-1 $\alpha$  em ambos os rins sugerindo um papel importante desta molécula na permanência de ASC no tecido lesado, além de seu efeito atractante. Estudos prévios descreveram resultados semelhantes em análises de rins e cérebro de animais tratados com MSC [111, 112]. Por outro lado, o tratamento com as VE resultou em efeito semelhante sobre a expressão de SDF-1 $\alpha$  nos rins, sugerindo que esta molécula pode ser transportada através de VE. As VE expressam receptores de quimiocinas referentes às células de origem entre eles o

receptor do SDF-1 $\alpha$  (CXCR4) conhecido por estar envolvido na migração de MSC aos locais de inflamação [113]. Apesar de baixos níveis do receptor CXCR4 estar presente na superfície de MSC, altos níveis do receptor são encontrados no interior das células que por sua vez, parecem funcionar como um reservatório podendo ser translocado para a membrana plasmática das MSC através da estimulação de quimiocinas contribuindo para a migração de MSC [114]. Este sistema pode explicar o papel das VE no aumento da expressão do SDF-1 $\alpha$  nos animais tratados com MV e EX. Este aumento, embora menor quando comparado as ASCs contribuiu para a migração das MV e EX no local de lesão em nosso modelo.

O clampeamento parcial da artéria renal esquerda foi eficiente em produzir hipertensão renovascular severa com o aumento progressivo da PAS durante seis semanas. Além disto, a hipóxia crônica resultou em inflamação e fibrose tecidual no rim clipado. Fibrose e inflamação também foram observadas no rim contralateral, o qual está sujeito aos efeitos da hipertensão arterial, tratando-se, portanto, de um rim hipertenso. Os tratamentos com ASCs, MV e EX resultaram em uma redução discreta da PAS na quarta semana, porém, ao contrário do grupo hipertenso não tratado, houve uma estabilização da PAS a partir da quarta semana sem maiores elevações. Este resultado foi semelhante ao obtido anteriormente com MSC obtidas de medula óssea [15, 53], reforçando desta maneira a capacidade das MSC de diversas origens em prevenir aumento progressivo nos níveis pressóricos independentemente da resolução da obstrução arterial.

Interessantemente, as MV e os EX produziram efeitos semelhantes às ASCs sobre a evolução da PAS, sugerindo que os efeitos benéficos dessas células sobre a PAS podem ser mediados pelas suas VE e que a terapia utilizando as VE seria uma alternativa interessante no controle da hipertensão renovascular.

Os animais hipertensos apresentaram redução do peso corporal e aumento do peso do coração, indicando a presença de hipertrofia cardíaca em consequência à hipertensão arterial. Apesar dos efeitos benéficos dos tratamentos em estabilizar a PAS, nenhum deles foi capaz de reduzir o peso do coração uma vez que, apesar da estabilização, os elevados níveis pressóricos persistiram. Como esperado o peso do rim estenótico foi reduzido e do rim contralateral aumentado como resultado do hiperfluxo e da hiperfiltração. Nenhum dos tratamentos interferiu nas variações de peso renal.

Em relação à função renal, os animais hipertensos não apresentaram alterações na creatinina sérica corroborando com trabalhos publicados previamente [15, 53, 107]. Este resultado provavelmente reflete um mecanismo de hiperfiltração glomerular pelo rim contralateral hipertenso como resultado do hiperfluxo e do aumento na pressão de perfusão, o que compensaria a redução da filtração glomerular pelo rim estenótico, conforme demonstrado anteriormente [53]. Apesar de não serem detectadas modificações na creatinina sérica e no *clearance* de creatinina, houve sinais de deterioração funcional, uma vez que seis semanas após o clampeamento os animais hipertensos não tratados desenvolveram proteinúria significativa indicando alterações importantes na estrutura glomerular causada pela hipoperfusão do rim estenótico e hiperperfusão do rim contralateral. Assim como observado anteriormente com MSC provenientes de medula óssea, o presente estudo mostrou que as ASCs também foram eficientes em reduzir a proteinúria. Interessante que este achado também foi observado com as MV, mas não com os EX. Este resultado corrobora com as diferenças de conteúdo entre as diferentes vesículas secretadas pelas MSC podendo resultar em respostas distintas mais ou menos eficientes.

Os animais hipertensos não tratados apresentaram aumento na diurese, o que é típico deste modelo experimental [15, 53]. Os tratamentos utilizando as células intactas ou com suas VE, não interferiram com a diurese. A ausência de efeitos dos tratamentos sobre a diurese pode ser interpretada como benéfica e estar relacionada à capacidade do rim contralateral em excretar água e solutos, o que poderia contribuir para melhorar os níveis pressóricos. Por outro lado, a manutenção da volemia é dependente da capacidade dos rins em excretar sódio. Este modelo de hipertensão renovascular é caracterizado por uma redução na excreção urinária de sódio pelo rim estenótico, o que pode ser compensado pelo rim contralateral através do mecanismo de diurese pressórica [53]. No presente estudo observamos que, considerando os dois rins, os animais hipertensos não tratados apresentaram uma redução na excreção urinária de  $\text{Na}^+$ , o que poderia contribuir para elevação da volemia e conseqüentemente da pressão arterial. Além disto, o aumento na diurese em paralelo à redução da excreção de  $\text{Na}^+$  indica que a poliúria não é sódio dependente e pode ser conseqüente a um déficit no mecanismo de concentração urinária pelo rim estenótico. Apesar de não interferir na diurese, os tratamentos com

ASCs e com EX melhoraram a excreção de  $\text{Na}^+$ , o que não foi observado com as MV. Os resultados indicam que o controle da osmolaridade plasmática foi preservado nos diferentes grupos. Estes resultados sugerem que a maior excreção urinária de sódio observada nos grupos tratados com ASC e EX provavelmente foi associada a uma menor retenção de água e, portanto, a uma redução do volume extracelular o que poderia contribuir para reduzir os níveis de pressão arterial. Assim, enquanto as ASCs foram eficientes em melhorar todos esses parâmetros funcionais, as MV foram benéficas em reduzir a proteinúria e os EX em melhorar a excreção de  $\text{Na}^+$ . Em conjunto, esses resultados sugerem que, de acordo com os benefícios apresentados neste trabalho, a escolha na utilização das ASCs ou de suas vesículas extracelulares no tratamento de HR poderiam seguir uma estratégia relacionada ao parâmetro que necessita correção.

Os efeitos benéficos das ASCs sobre os parâmetros da função renal, particularmente sobre a proteinúria e natriurese também foram observados previamente com MSC derivadas de medula óssea e esses benefícios foram atribuídos à redução da inflamação e a melhora na perfusão tecidual por mecanismo de neoangiogênese [15, 53]. A fibrose renal progressiva é a manifestação mais comum na doença renal crônica [115]. Estudos prévios demonstraram que a isquemia crônica leva a fibrose e inflamação renal [14]. Além disto, a hipertensão arterial e o aumento na pressão de perfusão renal corroboram para o início de processos inflamatórios e consequente infiltração de macrófagos e linfócitos levando a ativação de miofibroblastos contribuindo para a fibrose tecidual. Observamos que os rins estenótico e contralateral apresentaram aumento significativo na síntese de colágeno, um marcador de fibrose, e os tratamentos foram igualmente benéficos em reduzir a expressão do colágeno, indicando uma diminuição no processo fibrótico. O fator de transformação do crescimento beta ( $\text{TGF-}\beta$ ) é um potente indutor de fibrose renal aumentando a síntese de colágeno [116]. Como esperado, a expressão de  $\text{TGF-}\beta$  foi aumentada no rim estenótico e do rim contralateral dos animais hipertensos. O tratamento com ASCs, MV e EX resultou na redução significativa na expressão do  $\text{TGF-}\beta$  em ambos os rins o que provavelmente contribuiu para a redução do colágeno e consequentemente do processo fibrótico.

Sabidamente fatores pró-inflamatórios podem estimular a síntese de  $\text{TGF-}\beta$  e, portanto, de colágeno, contribuindo para a fibrose tecidual. As ASCs possuem

propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias, e podem ser, uma ferramenta atraente para atenuar os danos renais induzidos tanto pela hipóxia crônica (rim estenótico) como pela hipertensão arterial (rim contralateral). Os animais hipertensos apresentaram um aumento do marcador inflamatório IL-1 $\beta$  em ambos os rins, conforme demonstrado anteriormente [15]. Os tratamentos com ASCs e com os EX foram igualmente eficientes em reduzir os níveis de expressão da IL-1 $\beta$  principalmente no rim estenótico. Este efeito foi, no entanto, significativamente menor nos animais tratados com MV. Por outro lado, os tratamentos com ASC e MV foram eficientes em induzir aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 um fator também observado no grupo tratado com EX, porém, com menor eficiência. As diferenças na eficiência dos tratamentos novamente sugerem que o parâmetro a ser corrigido deve ser considerado na escolha da estratégia terapêutica utilizando células tronco ou suas vesículas extracelulares, uma vez que observamos diferenças da eficácia entre os tratamentos.

As células-tronco possuem a habilidade de migrar para tecido lesado e, este mecanismo está relacionado a um grande número de fatores de crescimento e citocinas produzidas localmente. Estes fatores e citocinas servem como quimioattractantes para as células-tronco [75, 117]. As VE por sua vez, são liberadas pelas células-tronco e podem ser internalizadas por outras células residentes ativando reações anti-inflamatórias através do transporte de proteínas, mRNA ou miRNAs regulando diversos tipos de sinalizações [118, 119].

A hipóxia é uma condição fisiológica frequentemente observada nos tecidos e ocorre quando há um desequilíbrio entre a oferta e consumo de oxigênio local [127, 128]. O fator de indução de hipóxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) é especificamente regulado nas condições de hipóxia sendo rapidamente degradado na presença de oxigênio e, portanto esta proteína tem sido utilizada como um marcador endógeno de hipóxia [129]. O HIF-1 $\alpha$  constitui-se em um fator de transcrição conhecido por regular a utilização de energia, metabolismo, stress oxidativo, sobrevivência e morte celular [127]. A hipóxia crônica nos rins eleva a expressão do HIF-1 $\alpha$  e pode ser um mecanismo fundamental para o recrutamento e migração de MSCs [130] levando ao aumento de SDF-1 e seu receptor (CXCR4) no tecido lesado, participando ativamente de processos de mobilização de MSC [106] como discutido acima.

Como esperado, o presente modelo apresentou um aumento do marcador de hipóxia HIF1- $\alpha$  no rim clipado, e essa expressão foi reduzida nos grupos tratados com ASCs, MV e EX demonstrando que sob condições de hipóxia e ativação de HIF1- $\alpha$  pode contribuir para o recrutamento de MSC e VE para o tecido isquêmico onde auxiliam na reparação tecidual. Estes resultados sugerem um papel importante da ativação do SDF-1 $\alpha$  através da expressão de HIF-1 $\alpha$  na regulação da migração e recrutamento de MSC para o rim isquêmico. O rim contralateral por sua vez, não apresenta sinais de hipóxia, mas a presença de ASCs foi verificada nesses rins, indicando que a quimioatração dessas células para o rim contralateral foi mediada pelo SDF-1 $\alpha$  provavelmente devido à presença de altas níveis moléculas inflamatórias no rim hipertenso.

**CONCLUSÃO**

---

## 6. CONCLUSÃO

As ASCs foram tão eficientes quanto às células-tronco derivadas de medula óssea na minimização dos efeitos renais da hipertensão renovascular e da hipóxia renal crônica. As VE liberadas por ASCs apresentaram efeitos benéficos semelhantes aos produzidos por ASCs, porém com menor eficiência em corrigir alguns parâmetros. Os resultados sugerem que as diferenças no conteúdo das vesículas extracelulares podem definir o seu papel terapêutico e, considerando-se os aspectos positivos dessas vesículas sobre as ASCs, os resultados sugerem que a escolha da estratégia terapêutica deve ser avaliada de acordo com os parâmetros a serem corrigidos.

**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Meyrier, A., G.S. Hill, and P. Simon, *Ischemic renal diseases: new insights into old entities*. *Kidney Int*, 1998. **54**(1): p. 2-13.
2. Voiculescu, A., et al., *Noninvasive investigation for renal artery stenosis: contrast-enhanced magnetic resonance angiography and color Doppler sonography as compared to digital subtraction angiography*. *Clin Exp Hypertens*, 2001. **23**(7): p. 521-31.
3. Conlon, P.J., et al., *Severity of renal vascular disease predicts mortality in patients undergoing coronary angiography*. *Kidney Int*, 2001. **60**(4): p. 1490-7.
4. Safian, R.D. and S.C. Textor, *Renal-artery stenosis*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(6): p. 431-42.
5. Goldblatt, H., et al., *Studies on Experimental Hypertension: I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia*. *J Exp Med*, 1934. **59**(3): p. 347-79.
6. Cervenka, L., et al., *Genetic inactivation of the B2 receptor in mice worsens two-kidney, one-clip hypertension: role of NO and the AT2 receptor*. *J Hypertens*, 2003. **21**(8): p. 1531-8.
7. Martinez-Maldonado, M., *Pathophysiology of renovascular hypertension*. *Hypertension*, 1991. **17**(5): p. 707-19.
8. Ploth, D.W., *Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney, one-clip renal vascular hypertension*. *Am J Physiol*, 1983. **245**(2): p. F131-41.
9. Guyton, A.C., *Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids*. *Science*, 1991. **252**(5014): p. 1813-6.
10. Cowley, A.W., Jr., *Long-term control of arterial blood pressure*. *Physiol Rev*, 1992. **72**(1): p. 231-300.
11. Navar, L.G., et al., *Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension*. *News Physiol Sci*, 1998. **13**: p. 170-176.
12. Chade, A.R., et al., *Distinct renal injury in early atherosclerosis and renovascular disease*. *Circulation*, 2002. **106**(9): p. 1165-71.
13. Chade, A.R., et al., *Mechanisms of renal structural alterations in combined hypercholesterolemia and renal artery stenosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(7): p. 1295-301.

14. Chade, A.R., et al., *Simvastatin promotes angiogenesis and prevents microvascular remodeling in chronic renal ischemia*. *Faseb j*, 2006. **20**(10): p. 1706-8.
15. Oliveira-Sales, E.B., et al., *Mesenchymal stem cells (MSC) prevented the progression of renovascular hypertension, improved renal function and architecture*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e78464.
16. Textor, S.C. and M.M. McKusick, *Renal artery stenosis: if and when to intervene*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2016. **25**(2): p. 144-51.
17. Lerman, L.O. and S.C. Textor, *Gained in translation: protective paradigms for the poststenotic kidney*. *Hypertension*, 2015. **65**(5): p. 976-82.
18. Cooper, C.J., et al., *Stenting and medical therapy for atherosclerotic renal-artery stenosis*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(1): p. 13-22.
19. Wheatley, K., et al., *Revascularization versus medical therapy for renal-artery stenosis*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(20): p. 1953-62.
20. Gafni, Y., et al., *Stem cells as vehicles for orthopedic gene therapy*. *Gene Ther*, 2004. **11**(4): p. 417-26.
21. Morrison, S.J., N.M. Shah, and D.J. Anderson, *Regulatory mechanisms in stem cell biology*. *Cell*, 1997. **88**(3): p. 287-98.
22. Weissman, I.L., *Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities*. *Science*, 2000. **287**(5457): p. 1442-6.
23. Odorico, J.S., D.S. Kaufman, and J.A. Thomson, *Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines*. *Stem Cells*, 2001. **19**(3): p. 193-204.
24. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. *Nature*, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
25. Rippon, H.J. and A.E. Bishop, *Embryonic stem cells*. *Cell Prolif*, 2004. **37**(1): p. 23-34.
26. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-76.
27. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 861-72.

28. Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, II, and K.V. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. J Embryol Exp Morphol, 1966. **16**(3): p. 381-90.
29. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
30. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
31. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
32. Robey, P.G., *Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising)*. Tissue Eng Part B Rev, 2011. **17**(6): p. 423-30.
33. Caplan, A.I., *Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How*. Stem Cells Int, 2015. **2015**: p. 628767.
34. Kopen, G.C., D.J. Prockop, and D.G. Phinney, *Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10711-6.
35. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
36. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
37. Gronthos, S., et al., *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13625-30.
38. Miura, M., et al., *SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5807-12.
39. Mimeault, M. and S.K. Batra, *Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications*. Stem Cell Rev, 2008. **4**(1): p. 27-49.
40. Chen, F.H., K.T. Rousche, and R.S. Tuan, *Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(7): p. 373-82.

41. Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons, *Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(4): p. 313-9.
42. Kadivar, M., et al., *In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(2): p. 639-47.
43. Kassem, M., *Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications*. Cloning Stem Cells, 2004. **6**(4): p. 369-74.
44. Caplan, A.I. and J.E. Dennis, *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. J Cell Biochem, 2006. **98**(5): p. 1076-84.
45. Grenz, A., et al., *Partial netrin-1 deficiency aggravates acute kidney injury*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e14812.
46. Askari, A.T., et al., *Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy*. Lancet, 2003. **362**(9385): p. 697-703.
47. Ryu, C.H., et al., *Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **398**(1): p. 105-10.
48. Ries, C., et al., *MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines*. Blood, 2007. **109**(9): p. 4055-63.
49. Lee, R.H., et al., *Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(1): p. 54-63.
50. Nauta, A.J. and W.E. Fibbe, *Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3499-506.
51. Fibbe, W.E., A.J. Nauta, and H. Roelofs, *Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1106**: p. 272-8.
52. Kean, T.J., et al., *MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation*. Stem Cells Int, 2013. **2013**: p. 732742.
53. Oliveira-Sales, E.B., et al., *Renovascular hypertension: Effects of mesenchymal stem cells in the contralateral hypertensive kidney in rats*. Clin Exp Hypertens, 2016. **38**(7): p. 586-593.

54. Nnodim, J.O., *Development of adipose tissues*. Anat Rec, 1987. **219**(4): p. 331-7.
55. Strem, B.M., et al., *Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells*. Keio J Med, 2005. **54**(3): p. 132-41.
56. Gimble, J. and F. Guilak, *Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential*. Cytotherapy, 2003. **5**(5): p. 362-9.
57. Mizuno, H., et al., *Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells*. Plast Reconstr Surg, 2002. **109**(1): p. 199-209; discussion 210-1.
58. Schaffler, A. and C. Buchler, *Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies*. Stem Cells, 2007. **25**(4): p. 818-27.
59. Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell, *Adipose-derived stem cells for regenerative medicine*. Circ Res, 2007. **100**(9): p. 1249-60.
60. Ikegame, Y., et al., *Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy*. Cytotherapy, 2011. **13**(6): p. 675-85.
61. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1294-301.
62. Izadpanah, R., et al., *Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue*. J Cell Biochem, 2006. **99**(5): p. 1285-97.
63. Fraser, J.K., et al., *Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology*. Trends Biotechnol, 2006. **24**(4): p. 150-4.
64. Stolzing, A., et al., *Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies*. Mech Ageing Dev, 2008. **129**(3): p. 163-73.
65. Caplan, A.I., *Why are MSCs therapeutic? New data: new insight*. J Pathol, 2009. **217**(2): p. 318-24.
66. Toyserkani, N.M., et al., *Concise Review: A Safety Assessment of Adipose-Derived Cell Therapy in Clinical Trials: A Systematic Review of Reported Adverse Events*. Stem Cells Transl Med, 2017. **6**(9): p. 1786-1794.

67. De Ugarte, D.A., et al., *Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow*. Cells Tissues Organs, 2003. **174**(3): p. 101-9.
68. Cowan, C.M., et al., *Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(5): p. 560-7.
69. Witkowska-Zimny, M. and K. Walenko, *Stem cells from adipose tissue*. Cell Mol Biol Lett, 2011. **16**(2): p. 236-57.
70. Dragoo, J.L., et al., *Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat*. Plast Reconstr Surg, 2005. **115**(6): p. 1665-73.
71. Lee, J.A., et al., *Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells*. Ann Plast Surg, 2003. **50**(6): p. 610-7.
72. Hicok, K.C., et al., *Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo*. Tissue Eng, 2004. **10**(3-4): p. 371-80.
73. Lendeckel, S., et al., *Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report*. J Craniomaxillofac Surg, 2004. **32**(6): p. 370-3.
74. Saad, A., et al., *Autologous Mesenchymal Stem Cells Increase Cortical Perfusion in Renovascular Disease*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(9): p. 2777-2785.
75. Humphreys, B.D. and J.V. Bonventre, *Mesenchymal stem cells in acute kidney injury*. Annu Rev Med, 2008. **59**: p. 311-25.
76. Hirschberg, R. and S. Adler, *Insulin-like growth factor system and the kidney: physiology, pathophysiology, and therapeutic implications*. Am J Kidney Dis, 1998. **31**(6): p. 901-19.
77. Liu, Y., *Hepatocyte growth factor and the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002. **11**(1): p. 23-30.
78. Togel, F., et al., *Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(5): p. F1626-35.
79. Reis, L.A., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repaired but did not prevent gentamicin-induced acute kidney injury through paracrine effects in rats*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44092.

80. Foudah, D., et al., *Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells*. Chromosome Res, 2009. **17**(8): p. 1025-39.
81. Jeong, J.O., et al., *Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy*. Circ Res, 2011. **108**(11): p. 1340-7.
82. Gheisari, Y., et al., *Stem cell-conditioned medium does not protect against kidney failure*. Cell Biol Int, 2011. **35**(3): p. 209-13.
83. Zhang, W., et al., *Extracellular vesicles in diagnosis and therapy of kidney diseases*. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **311**(5): p. F844-f851.
84. Bruno, S., et al., *Microvesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Enhance Survival in a Lethal Model of Acute Kidney Injury*, in *PLoS One*. 2012.
85. Lotvall, J., et al., *Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**: p. 26913.
86. Akers, J.C., et al., *Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies*. J Neurooncol, 2013. **113**(1): p. 1-11.
87. Borges, F.T., L.A. Reis, and N. Schor, *Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases*. Braz J Med Biol Res, 2013. **46**(10): p. 824-30.
88. Kanada, M., M.H. Bachmann, and C.H. Contag, *Signaling by Extracellular Vesicles Advances Cancer Hallmarks*. Trends Cancer, 2016. **2**(2): p. 84-94.
89. Bonventre, J.V., *Microvesicles from mesenchymal stromal cells protect against acute kidney injury*, in *J Am Soc Nephrol*. 2009: United States. p. 927-8.
90. Bruno, S., et al., *Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33115.

91. Zou, X., et al., *Human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles alleviate renal ischemic reperfusion injury and enhance angiogenesis in rats*. Am J Transl Res, 2016. **8**(10): p. 4289-99.
92. They, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 581-93.
93. Morigi, M., et al., *Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(7): p. 1794-804.
94. Hartner, A., et al., *Impaired Neovascularization and Reduced Capillary Supply in the Malignant vs. Non-malignant Course of Experimental Renovascular Hypertension*. Front Physiol, 2016. **7**: p. 370.
95. Mohring, J., et al., *Effects of saline drinking on malignant course of renal hypertension in rats*. Am J Physiol, 1976. **230**(3): p. 849-57.
96. Chade, A.R., et al., *Endothelial progenitor cells homing and renal repair in experimental renovascular disease*. Stem Cells, 2010. **28**(6): p. 1039-47.
97. Mao, J.J., et al., *Craniofacial tissue engineering by stem cells*. J Dent Res, 2006. **85**(11): p. 966-79.
98. Lener, T., et al., *Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper*. J Extracell Vesicles, 2015. **4**: p. 30087.
99. Bruno, S., S. Porta, and B. Bussolati, *Extracellular vesicles in renal tissue damage and regeneration*. Eur J Pharmacol, 2016.
100. Safari, S., et al., *Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A novel potential therapeutic avenue for cardiac regeneration*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2016. **62**(7): p. 66-73.
101. Xin, H., et al., *Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth*. Stem Cells, 2012. **30**(7): p. 1556-64.
102. Giebel, B., L. Kordelas, and V. Borger, *Clinical potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles*. Stem Cell Investig, 2017. **4**: p. 84.
103. Kansu, E., *Thrombosis in stem cell transplantation*. Hematology, 2012. **17** **Suppl 1**: p. S159-62.

104. Kalimuthu, S., et al., *In Vivo therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles with optical imaging reporter in tumor mice model*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 30418.
105. Reis, M., et al., *Recent Developments in Cellular Immunotherapy for HSCT-Associated Complications*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 500.
106. Dar, A., O. Kollet, and T. Lapidot, *Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice*. Exp Hematol, 2006. **34**(8): p. 967-75.
107. Hattori, K., et al., *Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3354-60.
108. Lapidot, T. and I. Petit, *Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells*. Exp Hematol, 2002. **30**(9): p. 973-81.
109. Lapidot, T., *Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **938**: p. 83-95.
110. Ghadge, S.K., et al., *SDF-1alpha as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction*. Pharmacol Ther, 2011. **129**(1): p. 97-108.
111. Liu, N., et al., *Migration of CXCR4 gene-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the acute injured kidney*. J Cell Biochem, 2013. **114**(12): p. 2677-89.
112. Yu, Q., et al., *SDF-1alpha/CXCR4 Axis Mediates The Migration of Mesenchymal Stem Cells to The Hypoxic-Ischemic Brain Lesion in A Rat Model*. Cell J, 2015. **16**(4): p. 440-7.
113. Du, T. and Y.J. Zhu, *The regulation of inflammatory mediators in acute kidney injury via exogenous mesenchymal stem cells*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 261697.
114. Wynn, R.F., et al., *A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2643-5.

115. Zhang, Y., et al., *Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppressing the renin-angiotensin system*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(6): p. 966-73.
116. Chevalier, R.L., et al., *Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy*. Pediatr Nephrol, 2010. **25**(4): p. 687-97.
117. Urbich, C., et al., *Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells*. Circulation, 2003. **108**(20): p. 2511-6.
118. Yeo, R.W., et al., *Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(3): p. 336-41.
119. Eirin, A., et al., *MicroRNA and mRNA cargo of extracellular vesicles from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. Gene, 2014. **551**(1): p. 55-64.
120. Lin, K.C., et al., *Combination of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes for protecting kidney from acute ischemia-reperfusion injury*. Int J Cardiol, 2016. **216**: p. 173-85.
121. Bernardo, M.E. and W.E. Fibbe, *Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation*. Cell Stem Cell, 2013. **13**(4): p. 392-402.
122. Newman, R.E., et al., *Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2009. **8**(2): p. 110-23.
123. DelaRosa, O., W. Dalemans, and E. Lombardo, *Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases*. Curr Opin Biotechnol, 2012. **23**(6): p. 978-83.
124. Mantovani, A., et al., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. J Pathol, 2013. **229**(2): p. 176-85.
125. Eirin, A., et al., *Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation*. Kidney Int, 2017. **92**(1): p. 114-124.
126. Taraboletti, G., et al., *Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells*. Am J Pathol, 2002. **160**(2): p. 673-80.
127. Zhang, W., et al., *HIF-1-mediated production of exosomes during hypoxia is protective in renal tubular cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2017. **313**(4): p. F906-f913.

128. Nangaku, M. and K.U. Eckardt, *Hypoxia and the HIF system in kidney disease*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(12): p. 1325-30.
129. Michiels, C., *Physiological and Pathological Responses to Hypoxia*. Am J Pathol, 2004. **164**(6): p. 1875-82.
130. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 858-64.
131. Pisitkun, T., R.F. Shen, and M.A. Knepper, *Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13368-73.
132. Oosthuyzen, W., et al., *Vasopressin Regulates Extracellular Vesicle Uptake by Kidney Collecting Duct Cells*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(11): p. 3345-3355.
133. Street, J.M., et al., *Exosomal transmission of functional aquaporin 2 in kidney cortical collecting duct cells*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 24): p. 6119-27.
134. 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 Res Ther, 2013. **4**(2): p. 34.