

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Rhana Carla Ruziska Tondato

Células-Tronco Renais na Hipertensão Arterial Sistêmica Espontânea em Ratos

Uberaba

2021

Rhana Carla Ruziska Tondato

Células-Tronco Renais na Hipertensão Arterial Sistêmica Espontânea em Ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração I “Bioquímica, Farmacologia e Fisiologia”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva.

Uberaba

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

T625c Tondato, Rhana Carla Ruziska
Células-tronco renais na hipertensão arterial sistêmica
espontânea em ratos / Rhana Carla Ruziska Tondato. -- 2021.
70 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) --
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021
Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Thaís Soares Farnesi de Assunção

1. Hipertensão. 2. Células-tronco. 3. Células-tronco mesenqui-
mais. 4. Lesão renal aguda. 4. Terapia celular. I. Silva, Valdo José
Dias da. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.12-008.331.1

Rhana Carla Ruziska Tondato

Células-Tronco Renais na Hipertensão Arterial Sistêmica Espontânea em Ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração I “Bioquímica, Farmacologia e Fisiologia”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva.

Uberaba, 22 de abril de 2021.

BANCA EXAMINADORA

VALDO JOSÉ DIAS DA SILVA

Titulação: Pós-doutor

Assinatura:

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

ROSELI APARECIDA DA SILVA GOMES

Titulação: Doutora

Assinatura:

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

POLIANA RODRIGUES ALVES DUARTE

Titulação: Doutora

Assinatura:

Instituição: Universidade Federal de Goiás / Regional Catalão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço imensamente a Deus pela saúde e força que me deu durante essa jornada.

Aos meus pais, Rosely e Carlos que me ajudaram muito psicologicamente e financeiramente durante um bom período ao vir para Uberaba sem conhecer literalmente ninguém, foi um longo caminho percorrido que devo muito a eles. Meu muito obrigada.

Ao meu noivo Leandro, que logo que cheguei na cidade, tornou meu companheiro de vida. Meu muito obrigada, meu caminho é muito mais leve ao seu lado.

Agradeço imensamente a dedicação e amizade da pesquisadora e amiga Dr^a Thaís Soares Farnesi de Assunção por todo apoio e comprometimento durante toda a minha jornada. Desde que cheguei no laboratório seu conhecimento e apoio foi essencial no meu caminho e projeto, aprendi muito com você. Você é demais como pessoa e como profissional, só tenho a te agradecer.

Ao meu colega de projeto Dôuglas Caixeta Nunes que me auxiliou e apoiou muito no início da minha jornada em Uberaba, nas disciplinas e no projeto.

Ao Lucas Felipe de Oliveira que participou ativamente da execução dos experimentos do projeto, agradeço imensamente pelo auxílio e disponibilidade todas as vezes que eu solicitei, muito obrigada pela dedicação e pela sabedoria.

Aos meus colegas do departamento e laboratório de fisiologia que de alguma maneira fizeram parte do trajeto da minha pesquisa: Elizabete, Angélica Cruz, Ana Maria Galdino, Waldir Oliveira, Paulo Oliveri Júnior, Glauco Finholdt, Donizete, Vanessa Capuano e Diógenes Maronezzi.

Aos amigos e pessoas que conheci durante essa jornada de mestrado ao Daniel Mendes Filho, a Sophia Prata e ao seu Valdo Donizzeti que legrava todas as minhas manhãs com seu entusiasmo.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica e a todos os laboratórios que direta ou indiretamente auxiliaram em meu trabalho, Laboratório de Imunologia, Laboratório de Histologia, Laboratório de Patologia, Laboratório de Medicina Tropical e ao Hemocentro.

Agradeço principalmente ao professor Drº Valdo José Dias da Silva, por ter me aceitado como aluna quando o procurei com interesse em estudar na UFTM e por ter confiado em meu trabalho, muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica que pode levar a alterações fisiológicas renais. Os rins, apresentam uma concentração de células-tronco mesenquimais renais (rMSCs) que podem auxiliar no reparo de lesão renal, causada pela hipertensão. Este estudo quantificou a presença de rMSCs e RSCs (Células-tronco Renais) em ratos com HAS (SHRs) em diferentes estágios da doença: estágio pré-hipertensivo (4 semanas) e estágio de hipertensão tardia (16 a 28 semanas), comparados com ratos normotensos (WKY). As RSCs foram isoladas dos rins dos animais nas diferentes fases e submetidas a citometria de fluxo para quantificação celular das células $c\text{-Kit}^+CD45^-$ e mostrou que os diferentes grupos de animais jovens apresentaram contagem numérica similares nos animais SHR e WKY ($0,55\pm 0,26\%$ versus $0,25\pm 0,28\%$ respectivamente, p =não significativo). Já nos animais adultos, o perfil numérico foi significativamente maior nos SHRs em comparação aos ratos WKY de mesma idade ($1,78\pm 0,31\%$ versus $0,52\pm 0,24\%$ nos ratos WKY, $p < 0,05$). Em relação à quantificação das rMSCs, contadas como CFU-Fs (Unidades Formadoras de Colônias Semelhantes a Fibroblastos) por 10.000 células cultivadas, os animais SHR jovens, apresentaram contagem numérica similar em seus respectivos controles ($6,6\pm 1,5$ CFU-F/10.000 células versus $7,1\pm 1,6$ CFU-F/10.000 células no grupo WKY, respectivamente, p =NS). Nos animais adultos, porém, a contagem de CFU-Fs foi significativamente maior nos SHRs ($58,1\pm 11,3$ CFU-F/10.000 células em SHRs versus $21,2\pm 2,1$ CFU-F/10.000 células em ratos WKY, $p < 0,01$). A morfometria microscópica renal revelou alterações glomerulares renais compatíveis com nefrosclerose nos SHRs adultos em relação aos demais grupos, quais sejam, o aumento da espessura da cápsula de Bowman ($12,8\pm 0,6$ mm em SHRs adultos versus $10,6\pm 0,8$ mm em ratos WKY adultos, $p < 0,05$) e fibrose. Concluímos que a relação entre o aumento na quantidade de células tronco mesenquimais $c\text{-Kit}^+CD45^-$ renais e o aumento de CFU-Fs nos animais com HAS, sugere a possibilidade de seu envolvimento na fisiopatologia da doença.

Palavras-chave: Células-tronco renais. Células-tronco Mesenquimais renais. Hipertensão Arterial Sistêmica.

ABSTRACT

Systemic arterial hypertension (SAH) is a clinical condition that can lead to renal physiological changes. The kidneys have a concentration of renal mesenchymal stem cells (rMSCs) that can help repair kidney damage caused by hypertension. This study quantified the presence of rMSCs and RSCs (Renal stem cells) in rats with SAH (SHRs) at different stages of the disease: prehypertensive stage (4 weeks) and late hypertension stage (16 to 28 weeks), compared with normotensive rats (WKY). The CRSS were isolated from the kidneys of the animals in the different phases and subjected to flow cytometry for cell quantification of the c-Kit⁺CD45⁻ cells and showed that the different groups of young animals had similar numerical count in the SHR and WKY animals ($0.55 \pm 0.26\%$ versus $0.25 \pm 0.28\%$ respectively, $p =$ not significant). In adult animals, the numerical profile was significantly higher in SHRs compared to WKY rats of the same age ($1.78 \pm 0.31\%$ versus $0.52 \pm 0.24\%$ in WKY rats, $p < 0.05$). Regarding the quantification of rMSCs, counted as CFU-Fs (Fibroblast-like Colony Forming Units) per 10,000 cultured cells, the young SHR animals showed similar numerical count in their respective controls (6.6 ± 1.5 CFU-F / 10,000 cells versus 7.1 ± 1.6 CFU-F / 10,000 cells in the WKY group, respectively, $p =$ NS). In adult animals, however, the CFU-Fs count was significantly higher in SHRs (58.1 ± 11.3 CFU-F / 10,000 cells in SHRs versus 21.2 ± 2.1 CFU-F / 10,000 cells in WKY rats, $p < 0.01$). Microscopic renal morphometry revealed renal glomerular changes compatible with nephrosclerosis in adult SHRs in relation to the other groups, namely, the increase in the thickness of the Bowman's capsule (12.8 ± 0.6 mm in adult SHRs versus 10.6 ± 0.8 mm in adult WKY rats, $p < 0.05$) and fibrosis. We conclude that the relationship between the increase in the amount of renal c-Kit⁺CD45⁻ mesenchymal stem cells and the increase in CFU-Fs in animals with SAH, suggests the possibility of their involvement in the pathophysiology of the disease.

Keywords: Renal stem cells. Renal mesenchymal stem cells. Systemic Arterial Hypertension.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Curva da função renal relacionando o débito de volume urinário com o aumento da pressão arterial sistêmica.18
- Figura 2: Curva da relação entre o débito urinário e/ou ingesta de sal e água com aumento de pressão arterial sistêmica.19
- Figura 3: Valores médios (\pm erro padrão) do percentual de células-tronco renais c-Kit⁺CD45⁻ dos animais SHR e WKY jovens e adultos. 58
- Figura 4: Gráficos de distribuição celular colhidos por citometria de fluxo representativos de cada um dos 04 grupos estudados: (A) SHR jovem; (B) WKY jovem; (C) SHR adulto e (D) WKY adulto. 59
- Figura 5: Valores médios (\pm erro padrão) do número de rMSC, expressas como CFU-Fs por 10.000 células cultivadas dos rins dos animais SHR e WKY jovens e adultos..60
- Figura 6: Visão macroscópica de placas de cultura correspondentes aos ensaios de CFU-Fs dos animais jovens (A e B) e adultos (C e D)..... 61
- Figura 7: Fotomicrografias de luz de cortes histológicos renais corados por hematoxilina-eosina mostrando a morfologia microscópica renal nos SHRs e ratos WKY jovens (A e B) e adultos (C e D). 61
- Figura 8: Fotomicrografias de luz polarizada de cortes histológicos renais corados por Picro Sirius Red evidenciando o grau de fibrose renal nos SHRs e ratos WKY jovens (A e B) e adultos (C e D). 62
- Figura 9: Correlação entre número de CFU-Fs quantificadas e percentual de fibrose nos rins dos animais estudados nos 04 grupos experimentais. 64

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Valores médios (\pm erro padrão) dos dados ponderais e hemodinâmicos de SHRs e ratos WKY em diferentes idades.....	57
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADSCs – Célula-tronco Mesenquimal Derivada de Tecido Adiposo

α -MEM - α -Minimum Essential Medium

Ang. I – Angiotensina I

Ang. II – Angiotensina II

AVC – Acidente Vascular Cerebral

bpm – batimentos por minuto

BrDU – 5-bromo-2desoxiuridina

Cat. – catálogo

Céls. - Células

CFU-F – Unidades Formadoras de Colônia Semelhante a Fibroblastos

c-kit – Receptor de Fator de Célula-tronco

colab. - colaboradores

DM – Diabetes *Mellitus*

DRC – Doença Renal Crônica

EC – Célula-tronco Embrionária

ECA - Enzima conversora de angiotensina

ECM – Matriz Extracelular

EPC-CM – Progenitor Epidérmico Derivado de Célula-tronco Mesenquimal

FC – Frequência cardíaca

FGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos

FITC - Fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína

G – Força G

G-CSF - Fator Estimulante de Colônia de Granulócito

GM-CSF - Fator Estimulante de Colônia Macrófago/granulócito

GPx – glutationa peroxidase

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HSC – Célula-tronco Hematopoiética

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

IFN- γ – Interferón- γ

IL-17 – Interleucina 17

i.p. - administração via intraperitoneal

iPS – Célula-tronco Pluripotente Induzida

IR – Insuficiência Renal

IRC – Insuficiência Renal Crônica

mg/Kg – miligrama/quilograma

MHC – Antígeno de Classe II

Min. - minutos

ml – mililitros

mmHg – milímetros de mercúrio

MSC – Célula-tronco Mesenquimal

NK – Natural Killer

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA – Pressão arterial

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PAX -2 – Marcador Embrionário Renal

PBS – Solução Salina/fosfato

PBS/EDTA - Solução Salina/fosfato com Etilenodiaminotetracético

PE – Fluorocromo Ficoeritrina

PEDF – Pigmento Derivado de Epitélio

PGDF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PGE2 – Prostaglandina E2

pH – potencial de Hidrogênio

rMSC – Célula-tronco Mesenquimal Renal

RSC – Célula-tronco Renal

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

rpm – rotação por minuto

SBF – Soro Bovino Fetal

Sca-1 – Antígeno 1 de célula-tronco

SDF-1 α /C-X-C – Fator 1 α Derivado de Estroma Celular com Ligante CXCL12

SHR – Rato Espontaneamente Hipertenso

SN – Sistema Nervoso

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNP – Sistema Nervoso Parassimpático

SNS – Sistema Nervoso Simpático

SOD – Superóxido dismutase

SRAA – Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

TGF- β – fator de Crescimento β

TGF- β 1- Fator de Crescimento β 1

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

UC-MSC – Célula-tronco Mesenquimal Derivada de Cordão Umbilical Humano

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial

WKY – Rato Wistar-Kyoto

μ m – micrometros

SUMÁRIO

SEÇÃO A - REVISÃO DA LITERATURA	16
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS).....	16
1.2 RATOS ESPONTÂNEAMENTE HIPERTENSOS.....	21
1.3 CÉLULAS-TRONCO.....	22
1.3.1 Células-tronco mesenquimais.....	24
1.3.1.1 Células-tronco mesenquimais renais.....	27
1.4 EXPRESSÃO GÊNICA.....	28
1.5 CÉLULAS-TRONCO RENAI E HAS	29
2 JUSTIFICATIVA	31
SEÇÃO B – ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL EM INGLÊS.....	32
ABSTRACT	33
1 INTRODUCTION.....	34
2 MATERIALS AND METHODS	38
ANIMALS AND EXPERIMENTAL GROUPS.....	38
HEMODYNAMIC STUDY	39
EUTHANASIA, NECROPSY AND OBTAINING BIOLOGICAL MATERIAL.....	39
QUANTIFICATION OF STEM CELLS C-KIT+ CD45 ⁻ IN THE KIDNEYS BY THE FLOW CYTOMETRY TECHNIQUE	41
QUANTIFICATION OF RENAL MESENQUIMAL STEM CELLS THROUGH THE COUNT OF FIBROBLAST-LIKE COLONY FORMING UNITS (CFU-F)	42
CONVENTIONAL HISTOLOGICAL PROCESSING	42
STATISTICAL ANALYSIS	43
3 RESULTS	43
4 DISCUSSION	45
5 CONCLUSION	49

6 REFERENCES.....	49
BIBLIOGRAFIA ADICIONAL.....	65
SEÇÃO C – CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES.....	69

SEÇÃO A - REVISÃO DA LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS)

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial (Silva JL, Souza DS, 2004) caracterizada pelo aumento da pressão arterial (PA): pressão sistólica ≥ 140 mmHg e pressão diastólica ≥ 90 mmHg (OMS, 2015) obtidas em ambiente tranquilo em condição de repouso e pelo menos por duas aferições subsequentes em dias diferentes (Silva JL, Souza DS, 2004), em indivíduos que não estão fazendo o uso de medicação anti-hipertensiva (Brasil, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a HAS atinge mais de um bilhão de pessoas no mundo. Em 2010, 4 em cada 10 pessoas apresentaram valores elevados de PA, o que resultou em óbito de aproximadamente 9,4 milhões de indivíduos. Nas Américas, a HAS atinge cerca de 250 milhões de pessoas adultas, representada por 20-40% da população (OMS, 2015), sendo que acomete mais de 50% dos indivíduos com idade entre 60-69 anos e 75% adultos com mais de 70 anos (Fuchs FD, 2016), ainda se faz mais frequente em mulheres (25,4%) quando comparada aos homens (19,5%) (Brasil, 2012).

A HAS é o principal fator de risco para doenças cardiovasculares, e pode ocasionar ataques cardíacos e/ou acidente vascular cerebral (AVC) (OMS, 2015). O aumento do valor pressórico arterial é proporcional ao risco de doença renal e cardiovascular. Ela é considerada o fator de risco dominante para doenças já estabelecidas como a trombose e aterosclerose que podem resultar em isquemia cerebral, vascular renal e periférica, e ainda cardíaca. Além disso, déficits cognitivos como a demência vascular/senil e doença de Alzheimer podem ser observados em pacientes hipertensos em fase precoce da vida. Além disso, associados à hipertensão estão alterações teciduais de órgãos-alvo: encéfalo, coração, vasos sanguíneos, rins (Rodrigues C, Silva DJ, Cabral CV, 2016) e retina (Silva JL, Souza DS, 2004). Assim, a junção de todos estes fatores caracteriza a HAS como uma das causas que mais reduz a expectativa e qualidade de vida dos indivíduos (Fuchs FD, 2016).

A HAS pode ser considerada essencial ou primária ou ainda hipertensão adquirida ou secundária. A origem da hipertensão primária é desconhecida, porém é a mais encontrada, sendo que somente de 10-20% dos pacientes apresentam a hipertensão secundária (Hirsch JS, Hong S, 2019) a qual é desenvolvida após algum fator pré-existente (Guyton AC, Hall JE, 2011).

Os fatores pré-existentes responsáveis pelo desenvolvimento dessa condição clínica podem ser modificáveis como: alcoolismo, hábitos alimentares, tabagismo, uso de anticoncepcionais orais (Silva JL, Souza DS, 2004), obesidade e sedentarismo (Guyton AC, Hall JE, 2011), uma vez que depende da vontade do indivíduo. Entre os fatores não modificáveis estão: gênero, genética (Silva JL, Souza DS, 2004), idade avançada (Mendes GS, Moraes CF, Gomes, L, 2014), etnia, histórico familiar de doença coronariana (Rodrigues C, Silva DJ, Cabral CV, 2016), diabetes *mellitus*, dislipidemias (Brasil, 2006; Hall JE et al., 2015), alterações renais (estenose das artérias renais, insuficiência renal crônica, doenças renais primárias), endócrinas (feocromocitoma, hipotireoidismo e hipertireoidismo, acromegalia, hiperaldosteronismo primário, hiperparatireoidismo primário, síndrome de Cushing, uso de anticoncepcionais orais), ou ainda outras causas (coartação da aorta, apneia do sono (Geleilate TJM et al, 2000).

O controle fisiológico frente à alteração de PA pode ocorrer de forma imediata (segundos a minutos) e/ou a longo prazo (dias a meses). O Sistema Nervoso (SN) (Grassi G, Mark A, Esler M, 2015) e endócrino atuam segundos após a alteração de PA, enquanto os rins são responsáveis pela regulação ao longo dos dias e meses, através do Sistema-Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) (Biancardi VC et al., 2017) e secreção hormonal (Coffman TM, 2011). Em adição, o sistema imune (McCarthy et al., 2013; Harrison DG, 2014) também pode atuar na HAS através da presença de células T de memória (Harrison DG, 2014).

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) age diretamente no controle de PA através de mecanismos sistêmicos em veias, artérias e coração. Para isto o Sistema Nervoso Simpático (SNS) e a inervação vagal do Sistema Nervoso Parassimpático (SNP) no coração, atuam simultaneamente segundos após a alteração na PA. O SNS é responsável por três mecanismos de controle: alteração da resistência periférica total de arteríolas, do bombeamento cardíaco através do controle venoso, e alteração da contração do próprio coração pelo estímulo direto do SNA. A noradrenalina liberada pelos nervos pós-ganglionares interage com os receptores alfa-adrenergicos dos

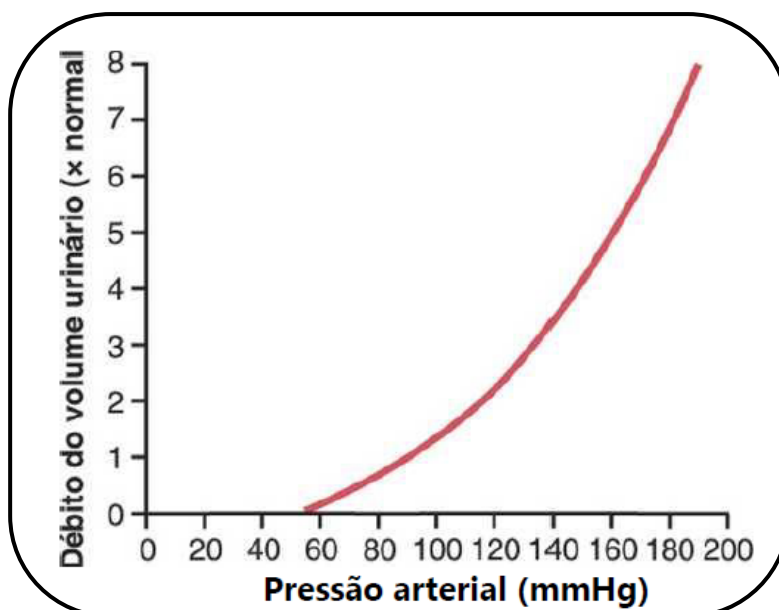
vasos sanguíneos e coração resultando no aumento da FC (frequência cardíaca) através da estimulação dos nós sinoatrial e atrioventricular no coração; contratilidade cardíaca via miocárdio e aumento na vasoconstricção da circulação periférica pelos receptores adrenérgicos. Em suma, o SNS estimula o aumento da PA (Drew RC, Charkoudian N, Park J, 2019).

De forma oposta, o SNP leva à diminuição da FC pela rápida redução da contratilidade do músculo cardíaco. Esse mecanismo ocorre pelo nervo vago cardíaco que libera acetilcolina, a qual interage com receptores colinérgicos muscarínicos nos nós sinoatrial e atrioventricular (Drew RC, Charkoudian N, Park J, 2019).

Os pressoreceptores conhecidos também como barorreceptores são terminações nervosas localizadas em artérias. Eles são estimulados por estiramento e atuam da mesma forma que o SN no controle da PA (Guyton AC, Hall JE, 2011).

Os rins atuam no controle da PA através da manutenção da homeostasia dos líquidos corporais, ou seja, mantendo o equilíbrio entre a ingestão e eliminação de água e sódio do organismo através da diurese e natriurese de pressão, além da regulação hormonal. O débito urinário é aumentado quando a PA se eleva, a fim de diminuir a quantidade de líquido corporal e conseqüentemente reduzir a PA (Figura 1). O SNS renal leva ao controle vascular, hormonal, tubular e glomerular. A interação entre o SNS renal no controle do volume sanguíneo e a regulação neural da circulação é de suma importância para o controle da PA (Guyton AC, Hall JE, 2011).

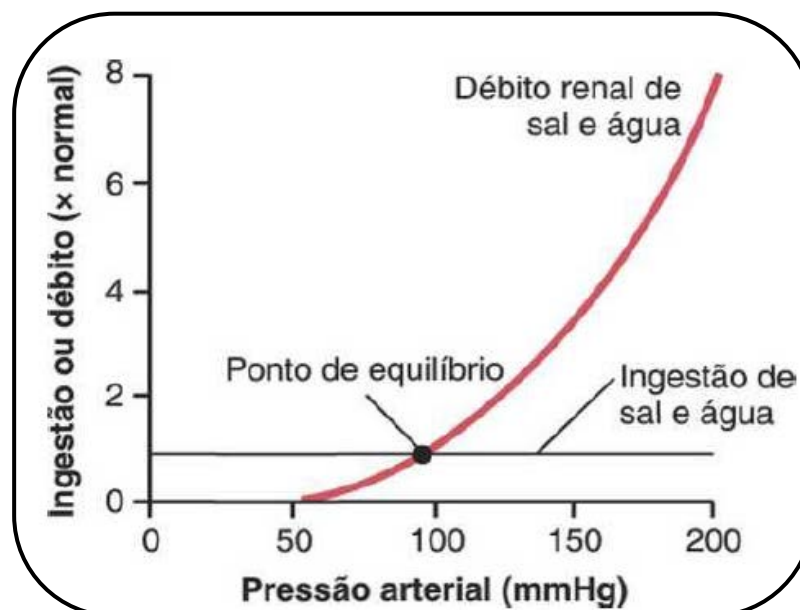
Figura 1: Curva da função renal relacionando o débito de volume urinário com o aumento da pressão arterial sistêmica. A diurese de pressão tem um papel central no controle à longo prazo da pressão arterial sistêmica.



Fonte: Guyton AC, Hall JE, 2011.

A retenção de sal pelo organismo ocorre quando sua ingestão é maior que a sua excreção (Khawaja Z, Wilcox CS, 2011). Em adição, pacientes sensíveis ao sal devido a danos renais ou secreção aumentada de hormônios antinatriuréticos, apresentam aumento de PA. Sendo assim, o mecanismo de natriurese deve estar fisiologicamente correto devido a sua extrema importância no controle de PA, já que sua ineficácia aumenta a retenção de líquidos pelo organismo (Figura 2) (Guyton AC, Hall JE, 2011).

Figura 2: Curva da relação entre o débito urinário e/ou ingestão de sal e água com aumento de pressão arterial sistêmica. Se o equilíbrio entre as curvas estiver deslocado, a pressão arterial encontra-se alterada para mais ou para menos.



Fonte: Guyton AC, Hall JE, 2011.

Além da regulação local de pressão, a regulação nervosa e hormonal atua diretamente sobre a PA.

O SNA regula a liberação de hormônios pelos rins segundos após o estímulo de redução da PA, sendo que a sua ativação anormal pode contribuir para o desenvolvimento da hipertensão e doenças cardíacas. A liberação hormonal ocorre através da ativação do SRAA, que apresenta a função primária de homeostase circulatória. Este sistema atua diretamente nos órgãos: rins, vasculatura, coração, cérebro e sistema imunológico (Sparks MA et al., 2014). A renina produzida e liberada pelos rins promove a formação da Angiotensina I (Ang. I), um hormônio decaeptídeo que apresenta leve característica vasoconstritora, logo após, é convertida (através da enzima conversora de angiotensina) em Angiotensina II (Ang. II), um octapeptídeo e potente vasoconstritor sistêmico e redutor da excreção de sal e água pelos rins (revisto por Gunalan S et al., 2019). Além disso, a Ang. II, estimula a liberação do hormônio aldosterona do córtex adrenal, que eleva a reabsorção de sódio e excreta potássio e hidrogênio pelos túbulos renais. Quando o estímulo recebido é o aumento de PA, o SRAA é inibido e o processo contrário ocorre (Kurlak LO et al., 2019).

Estudos demonstram que o sistema imune apresenta relevância na patogênese dos níveis pressóricos elevados. Em seu trabalho, Wu J e colab. (2016) relacionou o estresse oxidativo vascular à ativação imune e a arteriosclerose, os quais são encontrados em inflamação sistêmica de doenças vasculares comuns, como a hipertensão. Para isso demonstrou que camundongos com produção excessiva

oxidativa vascular, desenvolveram deposição vascular de colágeno, enrijecimento da aorta, disfunção renal e hipertensão com a idade, além disso, as células T de camundongos produziram altos níveis de IL-17 (Interleucina -17) e IFN- γ (Interferón γ). Nesse estudo, concluiu-se que os animais que têm as células T ativadas são suscetíveis ao desenvolvimento de HAS (Wu J et al., 2016).

Em adição, Madhur MS e colab. (2009), concluiu em seus estudos que a IL-17 é crítica para a manutenção de hipertensão induzida pela Ang. II, já que sua infusão em camundongos aumentou a produção de IL-17 a partir de células T resultando em hipertensão na fase inicial (Madhur MS et al., 2009).

Algumas drogas assim como a mudança do estilo de vida são utilizadas para o tratamento da HAS. Entre as principais escolhas de tratamento medicamentoso encontram-se os inibidores da enzima conversora de angiotensina ou bloqueadores do receptor de Ang. II, os diuréticos Tiazídicos e os bloqueadores de canais de cálcio (Ahluwalia M, Bangalore S, 2017). Considerando a mudança no estilo de vida, pode-se destacar a prática de exercício físico, a redução de peso e circunferência abdominal, redução da ingestão diária de álcool e sódio, a não suplementação com cálcio e magnésio, o aumento da ingestão de potássio, minimização de estresse e a manutenção de uma dieta saudável (Leung AA et al., 2017).

A doença renal crônica (DRC) e a HAS estão essencialmente relacionadas, sendo que a HAS pode complicar a DRC e/ou ser a sua causa. Sabe-se que a HAS é um dos fatores de risco para a DRC, assim como a DM, história familiar de doenças renais (Romão Junior JE, 2004), distúrbios metabólicos e imunológicos, infecções, entre outros (Guyton AC, Hall JE, 2011). Por isso, essa relação é estabelecida quando o aumento de PA ocorre em pacientes que têm a DRC e ainda depende do estágio em que o paciente se encontra, resultando em um ciclo vicioso, onde uma doença leva à outra.

1.2 RATOS ESPONTÂNEAMENTE HIPERTENSOS

Em 1963, Kozo Okamoto e Kyuzo Aoki buscavam um modelo animal experimental que apresentasse hipertensão arterial e que pudesse ser comparada à hipertensão arterial essencial humana. Esse estudo surgiu devido às divergências encontradas por outros autores, onde a hipertensão não estava presente em 100%

dos animais. Os autores notaram que ratos da cepa Wistar apresentavam diferentes valores de Pressão Arterial Sistólica (PAS), sendo assim, estes animais foram utilizados para os experimentos. A avaliação da PAS foi realizada através do método de oclusão caudal por pletismografia (Okamoto K, Aoki K, 1963).

Após consecutivos endocruzamentos, os estudiosos notaram que a terceira geração de animais apresentou 100% dos indivíduos hipertensos. Os animais foram considerados normotensos quando a PAS se apresentava ≤ 149 mmHg e hipertensos quando ≥ 150 mmHg (Okamoto K, Aoki K, 1963).

Os autores Okamoto-Aoki denominaram de “animais espontaneamente hipertensos” (SHR) todos os ratos da cepa Wistar que apresentaram hipertensão (Okamoto K, Aoki K, 1963).

A PA dos animais SHR começa a aumentar a partir da 5ª semana de vida, podendo ser considerados hipertensos entre a 7ª e 15ª semana e atingem um platô da 20ª a 28ª semana pós-nascimento (Fazan Junior R, Silva VJ, Salgado HC, 2001).

A fisiologia da hipertensão no animal SHR se deve ao aumento da resistência vascular periférica total devido a processos ativos e estruturais, além de apresentar progressiva hipertrofia cardíaca a qual leva à um débito cardíaco normal ou diminuído. Em adição, já foi demonstrado que existe uma hiperatividade simpática nestes animais. Alguns fatores externos ao animal também podem influenciar no desenvolvimento da HAS, como os fatores ambientais, alterações sociais, alteração no ciclo claro/escuro quando mantidos em biotério e ingesta muito aumentada de sódio, de forma contrária, o sexo do animal não apresenta influência na HAS (Fazan Junior R, Silva VJ, Salgado HC, 2001).

Assim, o modelo animal experimental com hipertensão foi estabelecido, sendo muito útil atualmente para estudos da HAS devido à similaridade da sua fisiopatogenia com a hipertensão essencial no homem (Fazan Junior R, Silva VJ, Salgado HC, 2001).

1.3 CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco são células indiferenciadas com grande capacidade de autorreplicação e autorrenovação (Dulak J et al., 2015), produtoras de progenitores diferenciados, que auxiliam na regeneração de tecidos (Blau HM, Brazelton TR,

Weimann JM, 2001) e apresentam um perfil característico de expressão gênica (Hishikawa K et al., 2015).

Elas podem ser classificadas de acordo com a sua origem em células tronco embrionárias ou células-tronco adultas (somáticas) (Daley GQ, 2015). Em adição, também são classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação em células totipotentes, pluripotentes, multipotentes e ainda como unipotentes (Sobhani A et al, 2017).

As células capazes de se diferenciar em todos os tecidos do corpo são chamadas de células-tronco embrionárias (EC), sendo às totipotentes células que estão presentes de 1-3 dias após a fecundação, e pluripotentes células encontradas na massa interna do blastocisto (4-14 dias após a fecundação), as quais se diferem daquelas por não ter a capacidade de se diferenciar em anexos embrionários (Kelly SJ, 1977; Sobhani A et al, 2017;).

Já as células-tronco adultas, que se espalharam pelos tecidos e órgãos, são multipotentes, às que têm uma capacidade de diferenciação reduzida, pois se diferenciam em tipos celulares de acordo com a particularidade da linhagem (Dulak J et al., 2015), como a de célula-tronco hematopoiéticas (HSC) (Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM, 2001) e as células-tronco mesenquimais (MSCs) (Sobhani A et al, 2016). E ainda, às unipotentes, que são capazes de se diferenciar somente em uma linhagem celular (Dulak J et al., 2015).

Outro tipo celular conhecido são as chamadas iPSS (Células-tronco Pluripotentes Induzidas) as quais são desenvolvidas em laboratório e são promissoras em pesquisas terapêuticas. Takahashi K et al. (2007), mostrou que as iPSS podem ser produzidas através de fibroblastos adultos de humanos com características semelhantes às ECs. A produção destas iPSS se deu através da transdução de quatro fatores de transcrição: Oct3 / 4, Sox2, Klf4 e c-Myc em células somáticas epidérmicas (Takahashi K et al., 2007).

Alguns fatores podem contribuir *in vivo* para o crescimento celular e assim determinar sua função, como: contato entre as células, fatores de crescimento e de diferenciação secretados por elas, matriz extracelular (ECM) e localização celular (Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM, 2001).

Tecidos pós vida embrionária podem ser reservatórios de células-tronco e contribuir para a sua regeneração após alguma doença, trauma ou alteração devido à idade (Pittenger MF et al., 1999). Embora as células-tronco de tecido adulto muscular,

cerebral e do fígado sejam responsáveis somente para reparo dos mesmos, elas podem ser encontradas em outros tecidos (Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM, 2001; Pittenger MF et al., 1999). Sendo assim, o seu uso é promissor no campo científico, na próxima seção encontra-se um maior detalhamento das MSCs, um tipo de célula-tronco adulta com características específicas.

1.3.1 Células-tronco mesenquimais

Um estudo realizado pelo patologista alemão Julius Cohnheim, em 1867, deu início aos resultados de características especiais de células-tronco. Seu estudo revelou a presença de células mononucleares não hematopoiéticas na medula óssea, as quais poderiam fornecer um suporte para hematopoese, crescimento e diferenciação de HSC, além de auxiliar no reparo de uma injúria tecidual (Chamberlain G, 2007).

Em 1976, Friedenstein e colaboradores afirmaram que a medula óssea apresenta células capazes de diferenciar-se em outras células mesenquimatosas e as denominaram de MSC. Após várias passagens em cultura *in vitro*, observaram a presença de células com aparência fibroblastosa (Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN, 1976) em cultura em monocamada, que foram definidas como Unidades Formadoras de Colônia Semelhante a Fibroblastos (CFU-F) (Bydlowski SP et al., 2009) podendo apresentar-se com depósitos de cartilagem ou osso (Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN, 1976). Esse ensaio permite uma quantificação aproximada das MSCs nos tecidos (Abdolmohammadia K et al., 2018).

Além da presença na medula óssea, as MSCs são encontradas próximas aos vasos sanguíneos de diversos órgãos incluindo o tecido adiposo e renal (Reinders ME, Fibbe WE, Rabelink TJ, 2009).

As MSCs também são chamadas de células estromais da medula óssea, células estromais mesenquimais multipotentes e ainda células-tronco esqueléticas e constituem apenas de 0,01 a 0,0001% das células nucleadas da medula adulta (Bydlowski SP et al., 2009; Reinders ME, Fibbe WE, Rabelink TJ, 2009).

Essas células apresentam ainda a capacidade de diferenciação mesodérmica (Kern S et al., 2006) em linhagem adipogênica, condrogênica, osteogênica e muscular (Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM, 2001; Dekel B et al., 2006); e/ou linhagens

celulares não-mesodérmicas como em hepatócitos, cardiomiócitos, neurônios, (Bydlowski SP et al., 2009), astrócitos (Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM, 2001) e células endoteliais (Reinders ME, Fibbe WE, Rabelink TJ, 2009).

Em termos gerais, as MSCs possuem tendência em apresentar características específicas de determinado tecido e podem se diferenciar em tipos específicos de células *in vitro* e *in vivo* (Meirelles LD, Chagastelles PC, Nardi NB, 2006).

Possuem *in vitro* a capacidade de aderência ao plástico e morfologia semelhante a fibroblastos. Devido à facilidade de isolamento, crescimento em cultura e característica de ser não imunogênica, elas apresentam vantagens em relação às ECs, mesmo tendo sua capacidade de diferenciação limitada (Bydlowski SP et al., 2009). Além disso, uma baixa densidade de plaqueamento celular se faz necessário, uma vez que outros tipos celulares são eliminados neste processo (Pittenger MF et al., 1999).

As MSCs apresentam capacidade de secreção de mediadores parácrinos como os fatores de crescimento, proteínas e citocinas, resultando em propriedades antiapoptótica (Zhao L et al., 2018) anti-inflamatória, angiogênica e antioxidativa (Abdolmohammadia K et al., 2018). Sendo assim, sua ação parácrina é o principal fator que leva à sua migração para o local de injúria tecidual (Zhao L et al., 2018).

Zhang e colaboradores (2014) mostraram em seu estudo que a hipóxia pré-condicionada durante o cultivo celular aumenta os efeitos parácrinos das MSCs derivadas de adipócitos humanos na lesão renal aguda, estimulando suas propriedades citadas acima, sendo promissora para terapia celular (Zhang W et al., 2014).

As MSCs não expressam moléculas coestimuladoras como o B7-1, B7-2, CD40 e seu ligante CD40L, e antígenos de classe II (MHC). Sendo assim, o seu papel na imunorregulação tecidual se dá pela alteração no perfil de citocinas das células T efectoras, natural killer (NK) ou ainda nas células dendríticas que resultam em uma maior atividade anti-inflamatória (Reinders ME, Fibbe WE, Rabelink TJ, 2009). As células NK expressam o marcador CD56 e são responsáveis pela resposta imune inata. Estudos comprovaram que as MSCs secretam prostaglandina E2 (PGE2) o que pode afetar a expressão do CD56 e diminuir a resposta das NK, auxiliando a inibição da resposta imune (Abdolmohammadia K et al., 2018).

Existe uma gama de evidências na literatura demonstrando que as espécies reativas de oxigênio (ROS) são indispensáveis para a produção e função celular,

exceto quando produzidas em grandes quantidades em condições patológicas como a osteoartrite. Quando presente em excesso no organismo, as ROS atrapalham a qualidade de sobrevivência das MSCs e conseqüente regeneração tecidual. O estudo feito por Liu e colaboradores (2015), mostra que o aumento da sobrevivência das MSCs em cultura pode se dar devido à diminuição das ROS, melhora de enzimas antioxidantes e resistência ao *stress* oxidativo exógeno em Células-tronco Mesenquimais Derivada de Cordão Umbilical Humano (UC-MSC) cultivadas com depósito de ECM descelularizada. A ECM descelularizada resultou em melhora da expansão de MSCs e pode prevenir o dano das ROS em transplante de MSCs (Liu X et al., 2015).

Ainda em relação às ROS, Sohn e colaboradores (2017), mostraram que os EPC-CM (Progenitores Epidérmicos Derivados de MSCs) apresentam propriedade anti-idade ou ainda ação antioxidante, pois aumentam a expressão de enzimas responsáveis por este processo. A ação antioxidante celular depende da catalase e glutathione peroxidase (GPx) que atuam removendo o peróxido de hidrogênio, e o superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Sendo assim, a presença de ROS inibe a ação dessas enzimas, atrapalhando o processo anti-idade que pode ser revertido com o aumento da expressão dessas enzimas pelas EPC-CMs (Sohn SJ et al., 2018).

Huang e colab. (2018) concluíram que a atividade antiapoptótica e a regulação da autofagia das células-tronco mesenquimais derivada de tecido adiposo (ADSCs) melhoram a injúria causada por isquemia cerebral. Neste estudo, eles utilizaram a proteína, fator de pigmento derivado de epitélio (PEDF), com propriedades neuroprotetoras, antioxidativa e anti-inflamatória juntamente com as ADSCs derivadas de rato, em casos de isquemia cerebral induzida (Huang X et al., 2018).

O tropismo das MSCs para o local da injúria tecidual pode ser explicado pela presença moléculas como as interleucinas 6 e 8, TGF- β 1 (Fator de Crescimento β 1) e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral) que são citocinas pró-inflamatórias; os fatores de crescimento como o FGF (Fator de Crescimento de Fibroblastos), SDF-1 α /C-X-C (Fator 1 α Derivado de Estroma Celular com o Ligante CXCL12), VEGF (Fator de Crescimento Endotelial), GM-CSF (Fator Estimulante de Colônia Macrófago/granulocito), G-CSF (Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos) e o PGDF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas); além da família de quimiocina XC, e quimiocinas como MCP-1/CCL2, CXC, CC, CX3C (Marofi F et al., 2017).

Estudos recentes demonstraram que o transplante de MSCs apresentou benefícios na falência renal aguda, isquemia cerebral, fibrose pulmonar idiopática, infarto agudo do miocárdio (IAM), injúria aguda no fígado e doença de Alzheimer; devido a sua capacidade de migrar para tecidos injuriados e inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias aumentando a sobrevivência das células danificadas (Abdolmohammadia K et al., 2018).

1.3.1.1 Células-tronco mesenquimais renais

No fim da nefrogênese gestacional são formadas duas estruturas derivadas do mesoderma intermediário: o broto uretérico e o metanéfron mesenquimal, resultando em tecidos não nefróticos, néfrons e interstício renal, respectivamente. O metanéfron mesenquimal é considerado um progenitor renal, tendo as células mesenquimais como progenitoras renais e estroma metanéfrico como progenitor estromal (Kang M, Youg-Mahn H, 2014).

Devido à origem mesenquimal dos néfrons, as MSCs são promissoras no reparo tecidual renal. O seu potencial reparador tem sido mostrado na literatura em modelos de roedores com falência renal (Kunter U et al., 2007).

A presença de células progenitoras é tida como o principal impulsionador de regeneração tecidual renal após uma injúria, localizada na papila renal (Oliver JA et al., 2009), no glomérulo, túbulos renais e no interstício. Estas células podem ser identificadas de acordo com suas propriedades: extrusão do corante de Hoechst, tipo de crescimento em cultura celular, expressão de marcadores específicos e ciclo celular lento o qual retém corantes em seu DNA como o BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina) (Kunter U et al., 2007).

O estudo das rMSCs (Células-tronco Mesenquimais Renais) torna-se atrativo uma vez que suas propriedades apresentam resultados positivos na medicina terapêutica. Seu detalhamento através da pesquisa científica na regeneração de doenças renais pode apresentar uma nova fonte de resultados para inovadoras terapias.

1.4 EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão fenotípica de genes que caracterizam células-tronco é de fundamental importância para sua localização e confirmação da presença das mesmas nos tecidos do organismo estudado. As MSCs expressam uma variedade de marcadores celulares, assim, a marcação fenotípica feita deve ser aliada aos outros ensaios citados anteriormente para a caracterização celular.

Nas MSCs de humano são expressos marcadores como o CD44, CD105, CD73, CD90, CD71 (Marofi F et al., 2018; Chamberlain G et al., 2007) e Stro-1; assim como os marcadores de adesão CD106, CD166, CD29 e ICAM-1. Por outro lado, não são expressos os marcadores de moléculas de adesão como o CD31, CD56 ou CD18; moléculas coestimuladoras como o CD80, CD40 ou CD86; e ainda marcadores hematopoiéticos como: CD45, CD34, CD14 ou CD11 (Chamberlain G et al., 2007).

As rMSCs expressam marcadores de hepatócitos, de endotélio e de neurônio, o que resulta em sua plasticidade. Os marcadores CD133 e CD44 são marcadores de células tronco em tecido adulto. O CD133 é um marcador progenitor endotelial encontrado em células estaminais adultas e raramente, porém já descrito, encontrada em interstício, glomérulos, túbulos renais (Maeshima A, Nakasatomi M, Nojima Y, 2014) e cápsula de Bowman. Isolados do glomérulo de ratos, alguns marcadores fenotípicos embrionários já foram expressos e descritos (Wnt1 e Wnt4) assim como marcadores fenotípicos de MSCs como o Oct-4 (Bruno S et al., 2009).

Em adição, os marcadores renais de células-tronco são expressos em locais específicos do rim, como nas células tubulares, na papila renal, no espaço intersticial e na cápsula de Bowman.

Nas células tubulares são expressos os marcadores de progenitores imaturos como o Sca-1 (células tronco com antígeno 1) (Hishikawa K et al., 2015) podendo ser isolado de rins adultos, com capacidade de formação tubular após injúria e diferenciação em linhagem neuronal, adipogênica e miogênica (Maeshima A, Nakasatomi M, Nojima Y, 2014).

O marcador c-kit (Receptor de Fator de Célula-tronco) é encontrado principalmente no ramo ascendente espesso da alça de Henle, região de hipóxia com células-tronco, também nos períodos iniciais do desenvolvimento renal (Schmidt-Ott et al., 2006). Ele promove a proliferação e sobrevivência celular. Além do c-kit, existem

marcadores com capacidade de autorrenovação e multipotência clonogênica como o CD24/CD133 (Stankov K, Popovic S, Mikov M, 2014).

Já nas papilas renais são encontrados os marcadores nestina e CD133, assim como os marcadores de células embrionárias como o Oct-3/4, Nanog, SOX2 e SSEA-4. No espaço intersticial são encontrados os marcadores Sca-1⁺CD45⁻, sendo essas células consideradas tronco progenitora e hematopoiética negativa, além do CD133 e Pax-2 (marcador embrionário renal). Na cápsula de Bowman são encontrados os marcadores CD24 e CD133 (Hishikawa K et al., 2015).

1.5 CÉLULAS-TRONCO RENAIIS E HAS

Pesquisas recentes com terapia celular e a engenharia tecidual são promissoras no reparo de danos teciduais causados por doenças agudas e crônicas na população. Pacientes em estágios terminais de doença crônica como a Insuficiência Renal Crônica (IRC), são o foco de muitos desses estudos, já que se encontram em diálise e/ou aguardando o transplante renal. O efeito terapêutico do uso de MSCs em modelo animal com dano renal tem sido amplamente relatado, porém pouco se sabe sobre o exato mecanismo delas no reparo tecidual (Reinders ME, Fibbe WE, Rabelink TJ, 2009).

Em 2017, Lira R demonstrou em sua pesquisa que ratos com HAS induzida apresentaram uma melhora significativa na injúria e funcionabilidade renal após a administração direta de células tronco mesenquimais (obtidas da medula óssea) nos rins. Como resultado os animais tiveram diminuição de PAS, ECA e receptores de angiotensina tipo 1, em adição tiveram a expressão restaurada de receptores de angiotensina tipo 2 e atividade da Na⁺K⁺ATPase (Lira, DR, 2017).

Um estudo realizado em nosso laboratório por Paula De e colab. em 2017, analisou o comportamento das MSCs frente à diabetes mellitus (DM) e revelou um maior número de CFU-F cardíacas em ratos com cardiomiopatia diabética quando comparados ao grupo controle. Além de mostrar que a funcionabilidade dessas células encontraram-se reduzidas no ensaio de diferenciação celular em linhagem adipogênica e osteogênica. Os dados encontrados pelos pesquisadores sugerem que as MSCs cardíacas podem contribuir para a patogenia da cardiomiopatia diabética (Paula DR et al., 2017). Espera-se que as alterações funcional e quantitativa das

MSCs encontradas na DM sejam relativamente parecidas com os resultados do nosso estudo.

Em seu estudo, Oliveira e colab. (2010) analisaram comparativamente as MSCs de medula óssea em animais SHR e WKY (Ratos Wistar-Kyoto). Encontraram alterações funcionais na diferenciação em linhagem adipogênica e osteogênica dos grupos, sendo que o grupo WKY apresentou maior capacidade funcional, indicando um déficit funcional nas células dos animais SHR. Em adição, o estudo não encontrou diferença significativa no ensaio de CFU-F realizado, sugerindo a mesma quantidade de MSCs entre os grupos estudados. Esse estudo sugeriu que as MSCs podem estar contribuindo para o processo patogenético da HAS (Oliveira LF, 2010). Estes dados contribuem para o nosso estudo já que também reúnem informações sobre a HAS.

Várias propostas terapêuticas são usadas atualmente para controle da HAS, porém a fisiopatologia da doença não é totalmente estabelecida. O rim é totalmente necessário no controle da PA já que é um dos órgãos alvo da HAS. O estudo das rMSCs se torna promissor nesta área, assim, novas descobertas se fazem necessárias para aumentar a chance de sucesso terapêutico. Este trabalho é inédito e visou elucidar a relação entre células-tronco renais e a HAS para um melhor entendimento e posterior terapia celular nesta doença.

2 JUSTIFICATIVA

Ainda que os diversos tipos de células-tronco renais acima descritos possam ser de fundamental importância para o desenvolvimento, prevenção ou reparo da injúria renal, nada é conhecido sobre uma eventual modificação do perfil biológico destas células no contexto da HAS.

Levando-se em consideração as alterações funcionais renais como eventuais causadoras da HAS ou as alterações morfofuncionais dos rins em consequência do estado hipertensivo crônico caracterizado por glomerulosclerose, fibrose intersticial e perivascular e rarefação microvascular, com déficit funcional epitelial e disfunção endotelial concomitante, uma interessante questão a ser levantada é: como estão as células tronco renais, em especial as c-Kit+ e as rMSCs, no contexto da HAS? O número destas células se modifica ao longo da evolução do estado pressórico pré-hipertensivo para a fase de elevação da PA até uma fase de hipertensão tardia? Nenhuma resposta foi encontrada na literatura para estas perguntas, justificando assim a proposta deste presente estudo.

Este trabalho inédito e atual possibilitou o conhecimento da relação entre células-tronco renais e a HAS e sugere que as mesmas possam estar envolvidas na fisiopatologia da doença.

SEÇÃO B – ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL EM INGLÊS**RENAL STEM CELLS IN SPONTANEOUS SYSTEMIC ARTERIAL
HYPERTENSION IN RATS**

Rhana Carla Ruziska Tondato, Thaís Soares Farnesi de Assunção, Dôuglas
Caixeta Nunes, Lucas Felipe de Oliveira, Valdo José da Silva Dias

Disciplina de Fisiologia, Instituto de Ciências Biológicas e Naturais,
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

Endereço para correspondência:

Valdo José da Silva Dias

R. Frei Paulino, 30 - Nossa Sra. da Abadia, Uberaba - MG, 38025-180

Telefone: +55 (34) 3700-6421

Fax: +55 (34) 3700-6466

E-mail: valdo@mednet.com.br

ABSTRACT

Systemic arterial hypertension (SAH) is a clinical condition that can lead to renal physiological changes. The kidneys have a concentration of renal mesenchymal stem cells (rMSCs) that can help repair kidney damage caused by hypertension. This study quantified the presence of rMSCs and RSCs (Renal stem cells) in rats with SAH (SHRs) at different stages of the disease: prehypertensive stage and late hypertension stage, compared with normotensive rats (WKY). The RSCs were isolated from the kidneys of the animals in the different phases and submitted to flow cytometry for cell quantification of $c\text{-Kit}^+\text{CD45}^-$ and showed that the different groups of young animals had similar numerical count in the SHR and WKY animals. In adult animals, the numerical profile was significantly higher in SHRs compared to WKY rats of the same age. Regarding the quantification of rMSCs, counted as CFU-Fs (Fibroblast-like Colony Forming Units) per 10,000 cultured cells, the young SHR animals, presented numerical count similar to their respective controls. In adult animals, however, the CFU-Fs count was significantly higher in SHRs. Microscopic renal morphometry revealed renal glomerular changes compatible with nephrosclerosis in adult SHRs in relation to the other groups, namely, the increase in Bowman's capsule thickness and fibrosis. Significantly higher values of $c\text{-Kit}^+\text{CD45}^-$ MSCs and rMSCs were observed in adult SHR rats, which may be at least partially implicated in the pathophysiology of kidney injury associated with SAH.

KEY WORDS: Renal stem cells. Renal mesenchymal stem cells. Systemic Arterial Hypertension.

1 INTRODUCTION

Systemic Arterial Hypertension (SAH) is a multifactorial clinical condition [1], characterized by a persistent increase in blood pressure (BP): systolic pressure ≥ 140 mmHg and diastolic pressure ≥ 90 mmHg [2]. According to the World Health Organization (WHO), SAH affects more than one billion people worldwide. In 2010, 4 out of 10 people had high BP values, which resulted in the death of approximately 9.4 million individuals. In the Americas, SAH affects approximately 250 million adult people, represented by 20-40% of the population [2], with over 50% affecting individuals aged 60-69 years and 75% adults over 70 years old [3, 4].

SAH is the main risk factor for cardiovascular diseases, and can cause heart attacks and / or stroke (2). The increase in arterial pressure value is proportional to the risk of kidney and cardiovascular disease. It is considered the dominant risk factor for established diseases such as thrombosis and atherosclerosis that can result in cerebral, renal and peripheral vascular ischemia, and even cardiac. In addition, hypertension is associated with tissue changes in target organs: brain, heart, blood vessels, kidneys [5] and retina [1]. Thus, the combination of all these factors characterizes SAH as one of the causes that most reduces the life expectancy and quality of individuals [3].

SAH can be considered essential or primary or acquired or secondary hypertension. The origin of primary hypertension is unknown, but it is the most found, being that only 5-10% of patients have secondary hypertension [6] which is developed after some pre-existing factor [7].

The kidneys act to control BP by maintaining the homeostasis of body fluids, that is, it maintains the balance between the intake and elimination of water and sodium

from the body through pressure diuresis and natriuresis, in addition to hormonal regulation. The urine output is increased when the BP is increased, in order to decrease the amount of body fluid and consequently reduce the BP [7].

The relationship between chronic kidney disease (CKD) and SAH is clearly defined in the literature, and SAH can complicate CKD and / or be its cause. It is known that SAH is one of the risk factors for CKD, as well as DM, family history of kidney diseases [8], metabolic and immunological disorders, infections, among others [7]. Therefore, this relationship is established when the increase in BP occurs in patients who have CKD and still depends on the stage at which the patient is, resulting in a vicious cycle, where one disease leads to another.

The presence of renal stem / progenitor cells is considered the main driver of renal tissue regeneration after an injury, located, according to recent studies, in the renal papilla [9] in the glomerulus, renal tubules and in the interstitium. These cells can be identified according to their properties: extrusion of the Hoechst dye, type of growth in cell culture, expression of specific markers and slow cell cycle which retains dyes in its DNA such as BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) [10].

The phenotypic expression of genes that characterize stem cells is of fundamental importance for their location and confirmation of their presence in the tissues of the studied organism. MSCs express a variety of cellular markers, so the phenotypic marking done must be combined with the other assays mentioned above for cell characterization. The rMSCs express hepatocyte, endothelium and neuron markers, which results in their plasticity. The CD133 and CD44 markers are stem cell markers in adult tissue. CD133 is an endothelial progenitor marker found in adult stem cells and rarely, but already described, found in the interstitium, glomeruli, renal tubules [11] and Bowman's capsule. Isolated from the glomerulus of rats, some

embryonic phenotypic markers have already been expressed and described (Wnt1 and Wnt4) as well as phenotypic markers of MSCs such as Oct-4 [12].

In addition, renal stem cell markers are expressed at specific sites in the kidney, such as tubular cells, the renal papilla, the interstitial space and the Bowman's capsule.

In tubular cells, the markers of immature progenitors such as Sca-1 (stem cells with antigen 1) are expressed [13] and can be isolated from adult kidneys, capable of tubular formation after injury and differentiation into a neuronal, adipogenic and myogenic lineage [11].

The c-kit marker (Stem Cell Factor Receptor) is found mainly in the thick ascending branch of the loop of Henle, a region of hypoxia with stem cells, also in the early periods of renal development [14]. It promotes cell proliferation and survival. In addition to the c-kit, there are markers capable of self-renewal and clonogenic multipotency such as CD24 / CD133 [15].

Nestin and CD133 markers are found in the renal papillae, as well as embryonic cell markers such as Oct-3/4, Nanog, SOX2 and SSEA-4. In the interstitial space, the Sca-1⁺CD45⁻ markers are found, these cells being considered a progenitor stem and negative hematopoietic, in addition to CD133 and Pax-2 (renal embryonic marker). In the Bowman's capsule, the CD24 and CD133 markers are found [13].

A study carried out in our laboratory by Paula De et al. in 2017, analyzed the behavior of MSCs against diabetes mellitus (DM) and revealed a greater number of cardiac CFU-F in rats with diabetic cardiomyopathy when compared to the control group, in addition to showing that the functionality of these cells was reduced in the cell differentiation in adipogenic and osteogenic lineage. The data found by the researchers suggest that cardiac MSCs may contribute to the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy [16].

In their study, Oliveira et al. (2010) analyzed bone marrow MSCs in SHR and WKY (Wistar-Kyoto Rats) comparatively. They found functional changes in the differentiation in adipogenic and osteogenic lineage of the groups, and the WKY group showed greater functional capacity, indicating a functional deficit in the cells of the SHR animals. In addition, the study found no significant difference in the CFU-F assay performed, suggesting the same amount of MSCs between the groups studied. This study suggested that MSCs may be contributing to the pathogenic process of SAH [17]. These data contribute to our study as they also gather information about SAH.

Several therapeutic proposals are currently used to control SAH, but the pathophysiology of the disease is not fully established. The kidney is totally necessary in the control of BP since it is one of Organs target organs of SAH. The study of rMSCs is promising in this area, thus, new discoveries are necessary to increase the chance of therapeutic success. This work is unprecedented and aimed to elucidate the relationship between renal stem cells and SAH for a better understanding and subsequent cell therapy in this disease.

Although the various types of renal stem cells may be of fundamental importance for the development, prevention or repair of renal injury, nothing is known about an eventual change in the biological profile of these cells in the context of SAH.

Taking into account renal functional changes as possible causes of SAH or morphofunctional changes in the kidneys as a result of the chronic hypertensive state characterized by glomerulosclerosis, interstitial and perivascular fibrosis and microvascular rarefaction, with epithelial functional deficit and concomitant endothelial dysfunction, an interesting question The question to be raised is: how are the renal stem cells, especially c-Kit + and rMSCs, in the context of SAH? Does the number of these cells change over the course of the pre-hypertensive blood pressure state to the

phase of BP increase until a phase of late hypertension? No answer was found in the literature for these questions, thus justifying the proposal of this study.

This work aimed to evaluate the biological profile of renal stem cells, especially c-kit + cells and rMSCs, in rats with SAH (SHRs) at different stages of the disease: prehypertensive stage and late hypertension stage, compared with normotensive rats (WKY).

2 MATERIALS AND METHODS

ANIMALS AND EXPERIMENTAL GROUPS

A total of 19 SHR rats and 16 male WKY rats, aged 4 weeks and 16 to 28 weeks, were employed. The animals were kept in controlled and stable conditions in a vivarium (temperature 22°C, humidity 40-70% and light-dark cycle of 12/12 hours), housed in standard boxes for rats with a maximum of 05 animals per box, with free access to water and feed. All animals came from the vivarium of the discipline of Physiology at the Federal University of Triângulo Mineiro, in Uberaba/MG, and received human care in accordance with the "Principles of Laboratory Animal Care" formulated by the National Society for Medical Research and the "Guide for the care and use of laboratory animals" prepared by the National Institute of Health [DHEW publication no (NHI) 80-123, revised 1978]. The experimental protocols begin to be executed after approval by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) at UFTM (Protocol N° 405).

The animals in this study were divided into four experimental groups:

- Young SHR group (n = 10). Composed of 04 week old SHR rats.

- Young WKY group (n = 09). Composed of 04 week old WKY rats.
- Adult SHR group (n = 09). Composed of SHR rats from 16 to 28 weeks of age.
- Adult WKY group (n = 07). Composed of WKY rats from 16 to 28 weeks of age.

HEMODYNAMIC STUDY

About one week before the isolation and cultivation protocol of the rMSCs, all animals had their BP and HR monitored once, using the caudal artery occlusion method, using an automated system (Digital Blood Pressure Meter LE -5000, Leticia SI, Barcelona, Spain), which allows an indirect measurement of SBP and HR, based on the point of pulse appearance, after the release of the caudal artery occlusion [18], this test was used to measure the baseline BP values of all animals.

EUTHANASIA, NECROPSY AND OBTAINING BIOLOGICAL MATERIAL

After performing the experimental procedures, the animals were anesthetized with sodium thiopental (250 mg/kg via i.p.) to remove the kidneys, which were collected to perform the experimental procedures in vitro.

In addition, to perform the conventional histology technique, the right kidney of each animal was collected and sectioned with a scalpel in a longitudinal section and preserved in 10% formaldehyde until processing.

ISOLATION OF KIDNEY CELLS

After euthanizing the animals, the left kidney of each animal was removed for isolation of the rMSCs, immersed in 5ml of PBS-EDTA (pH = 7.2) plus 1% of

penicillin/streptomycin antibiotic (GIBCO, cat. 10378- 016) and was kept cooled in a thermal box until processing.

In an aseptic environment inside the laminar flow hood, the organ with the aid of a scalpel was crushed into small fragments. After this process, the macerate was transferred to a Falcon tube, adding 2ml of 0.25% trypsin-EDTA (SIGMA, cat. 59427C). Then, the Falcon tube was transferred to a water bath system, where it remained at 37°C for 20 min. Subsequently, the action of trypsin was blocked with 4ml of PBS plus 5% of Bovine Fetal Serum - SBF (from English: fetal bovine serum. GIBCO, cat. 12657-029) (2x volume of trypsin). Then, the sample was centrifuged for 10 min., 400G and 4°C.

The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 2 ml of lysis buffer (tris-base buffer plus 1:10 ammonium chloride buffer, respectively) to remove red blood cells for a period of 5 min., At room temperature and at room temperature. shelter from the light. Then, 2 ml of PBS was added with 5% SBF and again centrifugation was performed (5 min., At 400g and 4°C).

After centrifugation, the supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended with 1 ml of PBS (pH = 7.4). An aliquot was used to count and study cell viability in a Neubauer chamber.

After counting and studying the viability, the cells were used “fresh” for the flow cytometry assay and / or placed in 24-well plates to assess the CFU-F formation capacity. The cells used in the CFU-F assay were kept in a 5% CO₂ oven at 37°C in α -MEM culture medium (from English: α -Minimum Essential Medium. GIBCO, cat.11900-016) containing 20% SBF and 1% penicillin / streptomycin, throughout the experimental procedure.

QUANTIFICATION OF STEM CELLS C-KIT⁺ CD45⁻ IN THE KIDNEYS BY THE FLOW CYTOMETRY TECHNIQUE

The cells obtained from the kidney as previously described were resuspended and aliquoted (100µl) in cytometry tubes and centrifuged at 300G for 10 min., The supernatant was discarded. 100µl of horse serum (GIBCO, cat.16050-122, Invitrogen) was added to the cell pellet to block nonspecific reactions and, after 10 min., 2 ml of PBS (pH = 7.4) was added prior to centrifugation (10 min., At 400g and 4°C). The cells were resuspended in 500 µl of PBS.

It is worth mentioning that in all tubes there were approximately 100,000 mononuclear cells obtained from the renal tissue of each animal. 2µl of the Fc blocker was added to all tubes (FcBlock/Purified rat anti-mouse CD16/CD32. BDBioscience, cat.553142). The tubes were kept refrigerated at 4°C for 20 min. and then the antibodies of interest were added to the research tubes.

For the evaluated stem cell line (c-kit⁺CD45⁻), four cytometry tubes were prepared for each animal:

- 1 tube received the anti-c-kit antibody;
- 1 tube received the anti-CD45 antibody;
- 1 tube received the c-kit and CD45 control isotypes;
- 1 tube considered the reaction blank, received the cell “pool”.

The samples received 2µl of anti-c-kit antibody coupled to Fluorescein Fluorochrome Isothiocyanate (FITC - Rat Anti-Mouse CD117. BDBioscience, cat. 553443) and 2µl of anti-CD45 antibody coupled to Fluorochrome Ficoeritrina (PE mouse anti-rat. BDBioscience, cat. 559878).

After marking, all tubes were incubated for 90 min. in the dark at a temperature of 4°C. Then, the material was subjected to 3 washing cycles where the sample was

resuspended in PBS (pH = 7.4) (centrifuged for 5 min., 400G at 4°C). In the last wash, the cells were resuspended in 500µl of PBS (pH = 7.4) and sent for analysis of cell phenotypes in a FACSAria III Flow Cytometer, using the CELLQUEST software (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA). In each sample, 50,000 events were acquired.

QUANTIFICATION OF RENAL MESENQUIMAL STEM CELLS THROUGH THE COUNT OF FIBROBLAST-LIKE COLONY FORMING UNITS (CFU-F)

Kidney cells were isolated and resuspended in 1 ml of α -MEM culture medium (from English: α -Minimum Essential Medium. GIBCO, cat.11900-016) containing 20% SBF (GIBCO, cat. 12657-029) and 1% penicillin / streptomycin (GIBCO, cat. 10378-016). They were plated in a 24-well plate at a density of approximately 10,000 cells / well (5,000 cells / cm²) for CFU-F counting. For each animal the tests were carried out in triplicates.

The culture plate was kept in a CO₂ oven (5%) at 37 ° C and the culture medium was changed on the 3rd and 8th days after cell plating. On the 13th day, the culture medium was removed and the cells washed with PBS (pH = 7.4), fixed and stained with Giemsa dye diluted in methanol at a 1:10 ratio. Once evaluated using an inverted microscope (Olympus, CKX41SF, Japan) in a bright field, all colonies that formed a cluster \geq 5 cells with a shape similar to fibroblasts were considered CFU-F.

CONVENTIONAL HISTOLOGICAL PROCESSING

Kidneys that were preserved in 10% Formol were processed. Once they were removed from Formol, they were washed twice with 70% alcohol and kept in it for 24 hours. Each organ was placed in the tissue preparation cassette and underwent serial

and progressive dilutions, being immersed for 30 min in each solution of: alcohol, xylol and paraffin (alcohol 70%, 80%, 90%, 95%; 3 solutions of absolute alcohol; 3 xylol solutions; 2 paraffin solutions). Soon after, they were embedded for 24 hours and then cut in a microtome with 5 μm thickness. The slides with the renal sections were stained with hematoxylin / eosin for morphological / morphometric analysis to quantify the inflammatory process. Additional slides were stained with Picro Sirius to assess interstitial fibrosis. The slides were analyzed under a light microscope (Axion Observer Z1, Karl Zeiss, Germany) and photographed (HSC digital camera. Karl Zeiss, Germany) by researchers in a blind test. The analysis of the images were made using the software Image J.

STATISTICAL ANALYSIS

The sample values, in each group, showing normal distribution and homogeneous variance, were considered parametric and expressed as mean / standard error of the mean. The comparison between the groups in this case was performed using two-way ANOVA followed by the Tukey's post-test. The sample values that did not show normal distribution and / or homogeneity of variance were compared with each other two by two using the non-parametric Mann-Whitney test. The differences between the comparisons made were considered statistically significant when the probabilities of casual occurrences were less than or equal to 5% ($p < 0.05$). All statistical tests were performed using the software Sigmasat, 2.0.3 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA, USA).

3 RESULTS

Table 1 shows the final body weight, heart rate and systolic blood pressure measured indirectly in the caudal artery in the two groups studied at the two different ages: young people aged 4 weeks and adults aged 16-28 weeks. Note the lower body weight in SHR when young and similar body weights in the two strains of rats as adults (Table 1).

The hemodynamic study showed that the animals in the young group, aged 4 weeks, had similar systolic BP values, which were still within the values considered normal, that is, below 140mmHg (Table 1). In adult animals, 16–28 weeks, systolic blood pressure was considerably higher in SHRs compared to WKY control rats ($p < 0.05$, Table 1). There was no difference between the groups regarding heart rate values (Table 1).

Quantification via flow cytometry of c-Kit⁺CD45⁻ stem cells in the kidneys of the different groups (Figure 3) showed that at 4 weeks of age, SHR animals presented numerical count of c-Kit⁺CD45⁻ cells similar to WKY animals ($0.55 \pm 0.26\%$ versus $0.25 \pm 0.28\%$ respectively, $p =$ not significant) (Figure 3). In adult animals, however, the numerical profile was significantly different, with adult SHRs showing a greater number of c-Kit⁺CD45⁻ stem cells compared to WKY rats of the same age ($1.78 \pm 0.31\%$ versus $0.52 \pm 0.24\%$ in WKY rats, $p < 0.05$) (Figure 3). Figure 4 shows representative plots of the distribution of c-Kit⁺CD45⁻ stem cells within the total kidney mononuclear cells.

Regarding the quantification of rMSCs, counted as CFU-Fs per 10,000 cultured cells, the young SHR animals, not yet hypertensive, presented a similar numerical count of these cells in comparison with their respective controls (6.6 ± 1.5 CFU-F / 10,000 cells versus 7.1 ± 1.6 CFU-F / 10,000 cells in the WKY group, respectively, $p =$ NS) (Figure 5). In adult animals, however, the CFU-Fs count was significantly higher

in SHRs (58.1 ± 11.3 CFU-F / 10,000 cells in SHRs versus 21.2 ± 2.1 CFU-F / 10,000 cells in WKY rats , $p < 0.01$) (Figure 5).

Illustrative images of CFU-Fs culture wells from animals representative of the four experimental groups at the two ages studied are shown in Figure 6.

Microscopic renal morphometry revealed renal glomerular changes compatible with nephrosclerosis in adult SHRs in relation to the other groups, namely, the increase in Bowman's capsule thickness (12.8 ± 0.6 mm in adult SHRs versus 10.6 ± 0.8 mm in adult WKY rats, $p < 0.05$) (Figure 7) and fibrosis (figure 8). Regarding renal morphometry, there was no change in the young group between SHR and WKY animals and they were still smaller than adult SHR animals (7.76 ± 0.56 μ m for WKY in young versus 8.12 ± 0.72 μ m for young SHRs). A significant positive correlation was observed between the amount of CFU-Fs and the degree of renal fibrosis (Figure 9).

4 DISCUSSION

The results obtained in the present work are the first in the literature to quantify different types of renal stem cells in spontaneously hypertensive rats, namely, the renal c-Kit⁺CD45⁻ and mesenchymal stem cells (rMSCs). Significantly higher values of c-Kit⁺CD45⁻ renal stem cells and renal mesenchymal stem cells were observed in spontaneously hypertensive adult rats, which may at least be partially involved in the pathophysiology of renal injury associated with systemic arterial hypertension.

The hemodynamic data obtained by the caudal artery occlusion method demonstrate that the BP of the SHR animals of 4 weeks of age are still within normal values. However, at the age of 16-28 weeks, the mean pressure is considerably high.

These results are in accordance with those described by Okamoto and Aoki (1963) and by Yamori, in which the BP increase starts at 5 weeks of age and between the 7th and 15th weeks of life, the animals are already considered hypertensive [19, 20].

Renal histological data show that arterial hypertension throughout its development is accompanied by significant morphological changes, notably glomerular changes and renal fibrosis, compatible with benign nephrosclerosis, long recognized as an evolutionary consequence of systemic arterial hypertension in laboratory animals [21] and in humans [22, 23]. Histological changes, as expected, were not present in rats at 4 weeks of age, when the hypertensive picture was still absent, confirming previous data from the literature on SHRs [21].

Regarding c-Kit⁺CD45⁻ renal stem cells, the present study showed a percentage of c-Kit⁺CD45⁻ renal stem cells between 0.25% to 0.52% of renal mononuclear cells in normotensive WKY rats, values compatible with those found by Rangel et al (2013, 2018) for c-Kit + CD45⁻ cells in Sprague-Dawley rats, also normotensive [24, 25]. In 04-week-old young SHR rats, the percentage of c-Kit⁺CD45⁻ renal stem cells was not different from that observed in WKY rats. Surprisingly, however, in adult SHRs in frank hypertension there was a marked increase of more than 3 times in the percentage of renal stem cells c-Kit⁺CD45⁻, a result that is unprecedented to our knowledge.

The reason for this marked increase is not known and will certainly deserve further studies for its adequate clarification. However, based on previous literature data [24, 26, 27] that c-Kit⁺CD45⁻ renal cells or negative lineages are mostly cells with stem/progenitor profiles, with great tissue regenerative potential kidney, it can be speculated that the increase of these cells in the kidneys of SHRs may be due to a reparative response to the chronic renal insult observed in the pathophysiology of

systemic arterial hypertension. As speculation, c-Kit⁺CD45⁻ cells in general, such as heart cells [28] and especially those of the kidneys, can generate endothelial cells [25, 27], thus contributing to compensatory neoangiogenesis, which would protect the kidneys of hypertensive patients facing endothelial dysfunction and microvascular rarefaction in the kidneys of this experimental model [29, 30]. Data on phenotypic protein expression in SHR kidneys show an increase in enzymes of the glycolytic pathway in animals with current hypertension, suggestive of hypoxia / ischemia in the kidneys of SHRs [31]. Interestingly, hypoxia / ischemia is one of the main stimuli for the expression of c-Kit⁺CD45⁻ and cell proliferation in several stem cells [32, 33, 34]. However, additional experiments need to be carried out to better clarify this matter.

With regard to renal mesenchymal stem cells, described in the kidneys for the first time by Meirelles et al. (2006), a significant increase in the number of these cells was observed (almost 3x more), quantified by the CFU-F assay, in adult SHR kidneys compared to normotensive control rats of the same age. In young SHRs of 4 weeks the numbers of rMSCs were not different from those observed in young WKY rats. [35].

The reasons for the greater number of rMSCs in the kidneys of adult SHRs in frank hypertension are not known. However, it can be speculated that such an increase may be due to a higher rate of proliferation of these cells in the kidneys of hypertensive patients compared to controls. However, the confirmation of this assertion requires more experiments, to evaluate the mitotic rate in vivo, for example, by the measure of incorporation of 5-BRDU or measure of Ki67 + cells. Renal mesenchymal stem cells, present mainly in the renal interstice or in perivascular subendothelial regions [36], have clonogenic and differentiating capacity in several cell lines, especially mesodermal, such as osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, endothelial cells and fibroblasts / myofibroblasts [35, 36]. In the present study, we found a significant positive

correlation between the amount of CFU-Fs in renal tissue and the percentage of renal fibrosis, strongly suggesting a deviation of differentiation of rMSCs towards fibroblasts. This finding is unprecedented and it is suggested here that rMSCs should be considered as important participants in the pathophysiological process of benign nephrosclerosis observed in the evolution of systemic arterial hypertension.

Data obtained from mesenchymal stem cells from others sources, mainly bone marrow, have shown that differentiation into fibroblasts and the consequent increased collagen secretion is observed when MSCs are stimulated in a TGF-Beta-type cytokine-rich microenvironment, Ang. II, aldosterone, reactive oxygen species and low levels of nitric oxide [37, 38]. Interestingly, similar molecular changes have been described in different tissue microenvironments, including the kidneys, of hypertensive animals such as SHRs and even in hypertensive patients [39]. Thus, it is possible that molecular factors present in the tissue microenvironment of hypertensive individuals may induce the differentiation of rMSCs into fibroblasts, which would then lead to the development of nephrosclerosis associated with hypertension. However, further experiments are needed to test this hypothesis.

Although the numerical values have not changed, data from our laboratory has shown functional changes in differentiation of bone marrow [17] and heart [40] mesenchymal stem cells in SHRs, which reinforces our findings in the present study. In addition, data obtained in type I diabetic rats with diabetic cardiomyopathy [16] and elderly mice [41] also show a strong association between the higher numerical value of CFU-Fs and the greater tissue fibrosis, suggesting that in fact changes in the molecular microenvironment in different pathophysiological situations they can induce the differentiation of MSCs towards the fibroblastoid phenotype. However, future

research needs to be carried out to better elucidate the existence of functional deficit and differentiation directed to fibroblasts in renal MSCs from adult SHRs.

5 CONCLUSION

This work shows, for the first time, a numerical increase in c-Kit⁺CD45⁻ renal stem cells and renal mesenchymal stem cells in the kidneys of spontaneously hypertensive adult rats. These same cells were not shown to be numerically modified in young SHRs. The numerical increase of these two different types of renal stem cells in hypertensive patients could somehow contribute to the pathogenesis of kidney injury associated with systemic arterial hypertension.

6 REFERENCES

- [1] Silva, JL; Souza, DS. Risk factors for systemic arterial hypertension versus teaching lifestyle. *Electronic Journal of Nursing*. Dec 2004; 6 (3): 330-335.
- [2] World Health Organization - WHO. Q & As on hypertension, Sep. 2015. Available at: <http://www.who.int/features/qa/82/en/>. Accessed on: 15 mar. 2017.
- [3] Fuchs FD. Comparison between drugs for initial treatment of systemic arterial hypertension. *OPA / WHO - Representation Brazil*. Mar 2016; 1 (3).

[4] Brazil. Health: Research reveals that 22.7% of Brazilians are hypertensive, Portal Brasil, 26 abr. 2012. Available at: <http://www.brasil.gov.br/saude/2012/04/pesquisa-revela-que-22-7-dos-brasileiros-sao-hipertensos>. Accessed on: 01 feb. 2017.

[5] Rodrigues, C; Silva, DJ; Cabral, CV. Risk factors for the development of arterial hypertension (SAH) among the nursing team. *Interdisciplinary Journal*. 01 Mar 2016; 9 (2): 117-126.

[6] Hirsch JS, Hong S. The Demystification of Secondary Hypertension: Diagnostic Strategies and Treatment Algorithms. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*. 11 Dec 2019; 21 (90).

[7] Guyton AC, Hall JE. *Treatise on Medical Physiology*. 12th ed. São Paulo: Elsevier, 2011.

[8] Romão Júnior JE. Chronic Kidney Disease: Definition, Epidemiology and Classification. *Brazilian Journal of Nephrology*. 26: 1-3, 2004.

[9] Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 114:795–804, 2004.

[10] Kunter U, Rong S, Boor P, Eitner F, Muller-Newen G,‡ Djuric Z, Roeyen CR, Konieczny A, Ostendorf T, Villa L, Milovanceva-Popovska M, Kerjaschki D, Floege J. Mesenchymal Stem Cells Prevent Progressive Experimental Renal Failure but

Maldifferentiate into Glomerular Adipocytes. *J Am Soc Nephrol*. Mar 2007; 18:1754-1764.

[11] Maeshima A, Nakasatomi M, Nojima Y. Regenerative Medicine for the Kidney: Renotropic Factors, Renal Stem / Progenitor Cells, and Stem Cell Therapy. *BioMed Research International*. May 8, 2014.

[12] Bruno S, Bussolati B, Grange C, Collino Federica, Di LV, Herrera MB, Biancone L, Tetta C, Segoloni G, Camussi G. Isolation and Characterization of Resident Mesenchymal Stem Cells in Human Glomeruli. *Stem cells and development*. Feb 2, 2009; 18 (6): 867-880.

[13] Hishikawa K, Takase O, Yoshikawa M, Tsuiimura T, Nangaku M, Takato T. Adult Stem-like cells in kidney. *World Journal of Stem Cells*. March 26, 2015; 7 (2): 490-494.

[14] Schmidt-Ott KM, Chen X, Paragas N, Levinson RS, Mendelsohn CL, Barasch J. c-kit delineates a distinct domain of progenitors in the developing kidney. *Developmental Biology*. 299: 238–249, 2006.

[15] Stankov K, Popovic S, Mikov M. C-KIT Signaling in Cancer Treatment. *Current Pharmaceutical Design*. 2014; 20(17): 2849-2880.

[16] Paula DRM, Capuano V, Filho Mendes D, Carneiro AC, de Oliveira Crema V, de Oliveira LF, Silva VJ. Biological properties of cardiac mesenchymal stem cells in rats with diabetic cardiomyopathy. *Life Sciences*. Aug 30, 2017; 45–52.

[17] Oliveira LF. Evaluation of MO Mesenchymal Stem Cells in Normotensive Wistar-Kyoto (WKY) and Spontaneously Hypertensive (SHR) Rats. Master's Dissertation in Pathology. CPGP / UFTM, Uberaba-MG, 2010.

[18] Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davisson RL, Hall JE. Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 2: blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Mar 2005; 25(3):22-33.

[19] Okamoto K, Aoki K. Development of a Strain of Spontaneously Hipertensive Rats. *Japanese Circulation Journal.* Mar 1963; 27: 282-293.

[20] Yamori Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed.). *Experimental and Genetic Models of Hypertension. Handbook of Hypertension.* Elsevier, 224-39, 1984.

[21] Okamoto K, Aoki K, Nosaka S, Fukushima M. Cardiovascular diseases in the spontaneously hypertensive rat. *Jpn Circ J.* 1964; 28: 943-252.

[22] Hill GS. Hypertensive nephrosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008; 17 (3): 266-270.

[23] Alpers, CE. Benign nephrosclerosis. In: *Robbins and Cotran Pathology: Pathological Basis of Diseases*. Ed. By V Kumar, AK Abbas, N Fausto and JC Aster. 8th Edition; 2010. Elsevier Editora Ltda. page: 957.

[24] Rangel EB, Gomes SA, Dulce RA, Premer C, Rodrigues CO, Kanashiro-Takeuchi RM, Oskouei B, Carvalho DA, Ruiz P, Reiser J, Hare JM. C-kit (+) cells isolated from developing kidneys are a novel population of stem cells with regenerative potential. *Stem Cells*. 2013; 31 (8): 1644-1656.

[25] Rangel EB, Gomes SA, Kanashiro-Takeuchi R, Saltzman RG, Wei C, Ruiz P, Reiser J, Hare JM. Kidney-derived c-kit + progenitor / stem cells contribute to podocyte recovery in a model of acute proteinuria. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14723.

[26] Qi G, Lin M, Xu M, Manole CG, Wang X, Zhu T. Telocytes in the human kidney cortex. *J Cell Mol Med*. 2012; 16 (12): 3116-3122.

[27] Gomes SA, Hare JM, Rangel EB. Kidney-Derived c-Kit + Cells Possess Regenerative Potential. *Stem Cells Transl Med*. 2018; 7 (4): 317-324.

[28] Leri A, Kajstura J, Anversa P. Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ Res*. 2011; 109 (8): 941-961.

[29] Hamet P, Moreau P, Dam TV, Orlov SN, Tea BS, Blois D, Tremblay J. The time window of apoptosis: a new component in the therapeutic strategy for cardiovascular remodeling. *J Hypertens* 1996; 14 (5): S65-S70.

[30] La Russa D, Brunelli E, Pellegrino D. Oxidative imbalance and kidney damage in spontaneously hypertensive rats: activation of extrinsic apoptotic pathways. *Clin Sci (Lond)*. 2017; 131 (13): 1419-1428.

[31] Yu M, Wang X, Du Y, Chen H, Guo X, Xia L, Chen J. Comparative analysis of renal protein expression in spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens*. 2008; 30 (5): 315-325.

[32] Jögi A, Øra I, Nilsson H, Lindeheim A, Makino Y, Poellinger L, Axelson H, Pålman S. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99 (10): 7021-7026.

[33] Bellio MA, Rodrigues CO, Landin AM, Hatzistergos KE, Kuznetsov J, Florea V, Valasaki K, Khan A, Hare JM, Schulman IH. Physiological and hypoxic oxygen concentration differentially regulates human c-Kit + cardiac stem cell proliferation and migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016; 311 (6): H1509-H1519.

[34] RajendranNair DS, Karunakaran J, Nair RR. Sub-physiological oxygen levels optimal for growth and survival of human atrial cardiac stem cells. *Mol Cell Biochem*. 2017; 432 (1-2): 109-122.

[35] Meirelles LD, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*. Feb 13, 2006; 119: 2204-2213.

[36] Pelekanos RA, Li J, Gongora M, Chandrakanthan V, Scown J, Suhaimi N, Brooke G, Christensen ME, Doan T, Rice AM, Osborne GW, Grimmond SM, Harvey RP, Atkinson K, Little MH. Comprehensive transcriptome and immunophenotype analysis of renal and cardiac MSC-like populations supports strong congruence with bone marrow MSC despite maintenance of distinct identities. *Stem Cell Res*. 2012; 8 (1): 58-73.

[37] Krstic J, Trivanovic D, Obradovic H, Kukolj T, Bugarski D, Santibanez JF. Regulation of Mesenchymal Stem Cell Differentiation by Transforming Growth Factor Beta Superfamily. *Curr Protein Pept Sci*. 2018; 19 (12): 1138-1154.

[38] Taki Z, Gostjeva E, Thilly W, Yaseen B, Lopez H, Mirza M, Hassuji Z, Vigneswaran S, Ahmed Abdi B, Hart A, Arumalla N, Thomas G, Denton CP, Suleman Y, Liu H, Venturini C, O'Reilly S, Xu S, Stratton R. Pathogenic Activation of Mesenchymal Stem Cells Is Induced by the Disease Microenvironment in Systemic Sclerosis. *Rheumatol arthritis*. 2020; Online ahead of print.

[39] Coffman TM. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nature medicine*. Nov 2011; 17 (11): 1402-09.

[40] Ribeiro, PC. Cardiac stem cells in spontaneous arterial hypertension in rats. [dissertation]. Uberaba: Federal University of Triângulo Mineiro; 2016.

[41] Cieslik KA, Trial J, Entman ML. Defective myofibroblast formation from mesenchymal stem cells in the aging murine heart rescue by activation of the AMPK pathway. *Am J Pathol.* 2011; 179 (4): 1792-1806.

TABLE

Table 1. General data of experimental animals: mean values (\pm standard error) of weight and hemodynamic data of SHRs and WKY rats at different ages.

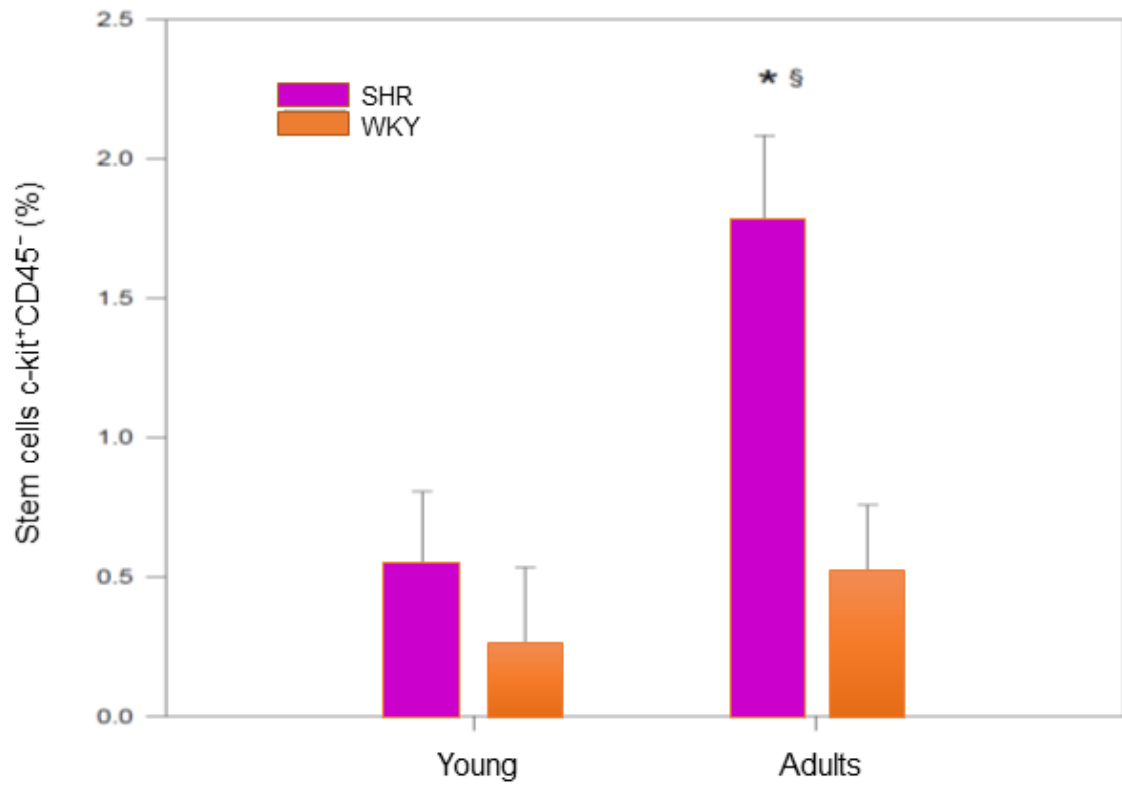
	SHR Young (n=10)	WKY Young (n=9)	SHR Adults (n=9)	WKY Adults (n=7)
Body Weight (grams)	72,8 \pm 3,8 [#]	141,0 \pm 9,0	337,7 \pm 23,4 \S	377,3 \pm 14,2 [#]
PAS (mmHg)	128,8 \pm 3,1	130,5 \pm 2,1	189,4 \pm 5,1 [*]	119,4 \pm 4,5
FC (bpm)	422,0 \pm 8,4	358,0 \pm 6,1	430,8 \pm 14,8	374,3 \pm 44,6

SHR = Spontaneously Hypertensive Rats; WKY = Wistar-Kyoto control mice; SBP = systolic blood pressure; HR = heart rate; mmHg = millimeters of mercury; bpm = beats per minute. * P <0.01 versus adult WKY; \S P <0.05 versus young SHR; # P <0.05 versus young WKY.

Source: Author, 2020.

FIGURES

Figure 3: Mean values (\pm standard error) of the percentage of renal stem cells c-Kit⁺CD45⁻ of young and adult SHR and WKY animals. (* p <0.05 versus adult WKY group; § p <0.05 versus young SHR).



Source: Author, 2020.

Figure 4: Cell distribution graphs collected by flow cytometry representative of each of the 04 groups studied: (A) young SHR; (B) WHY young; (C) adult SHR and (D) adult WKY. Percentage value in window Q4 represents the number of c-Kit⁺CD45⁻ stem cells in total renal mononuclear cells.

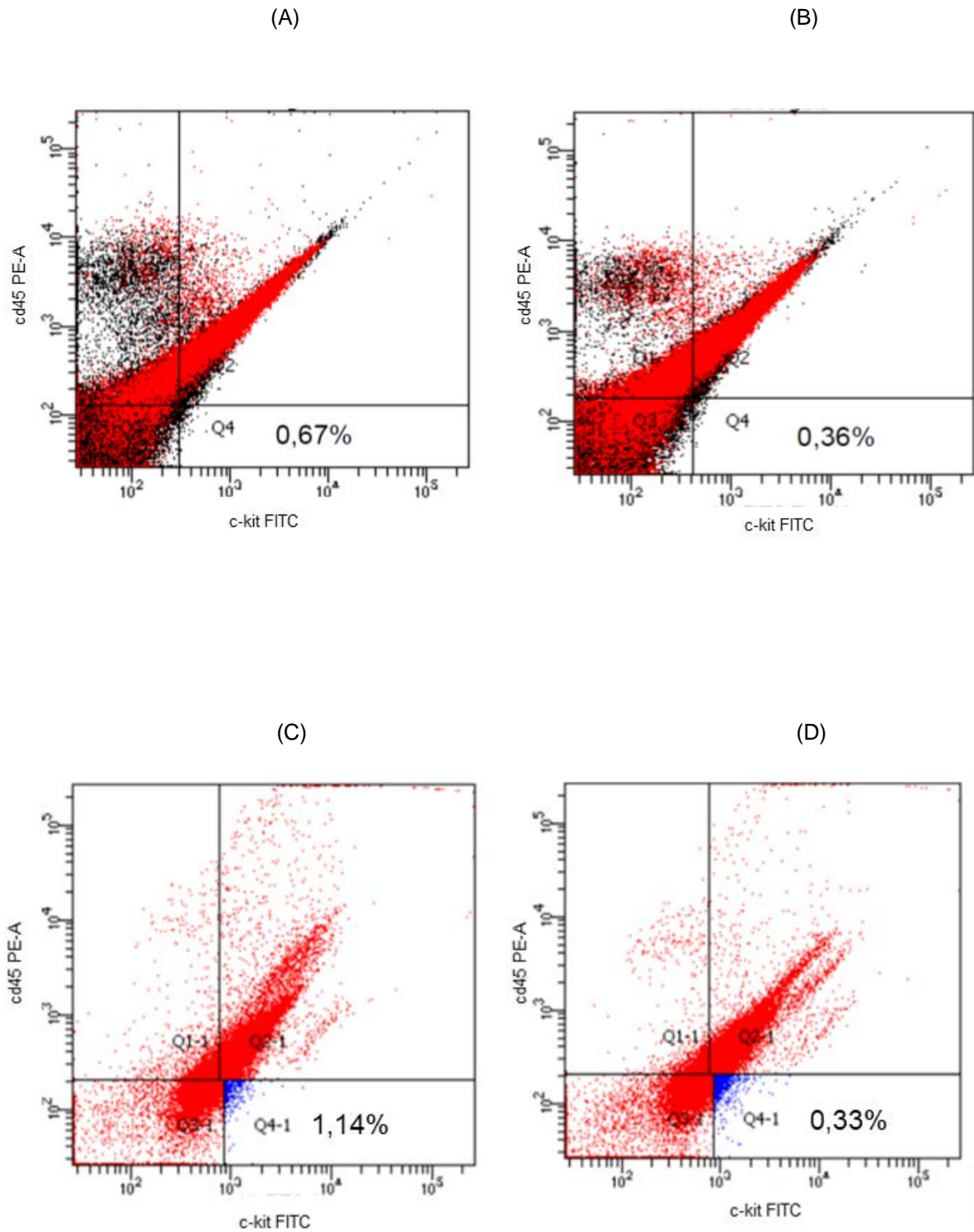
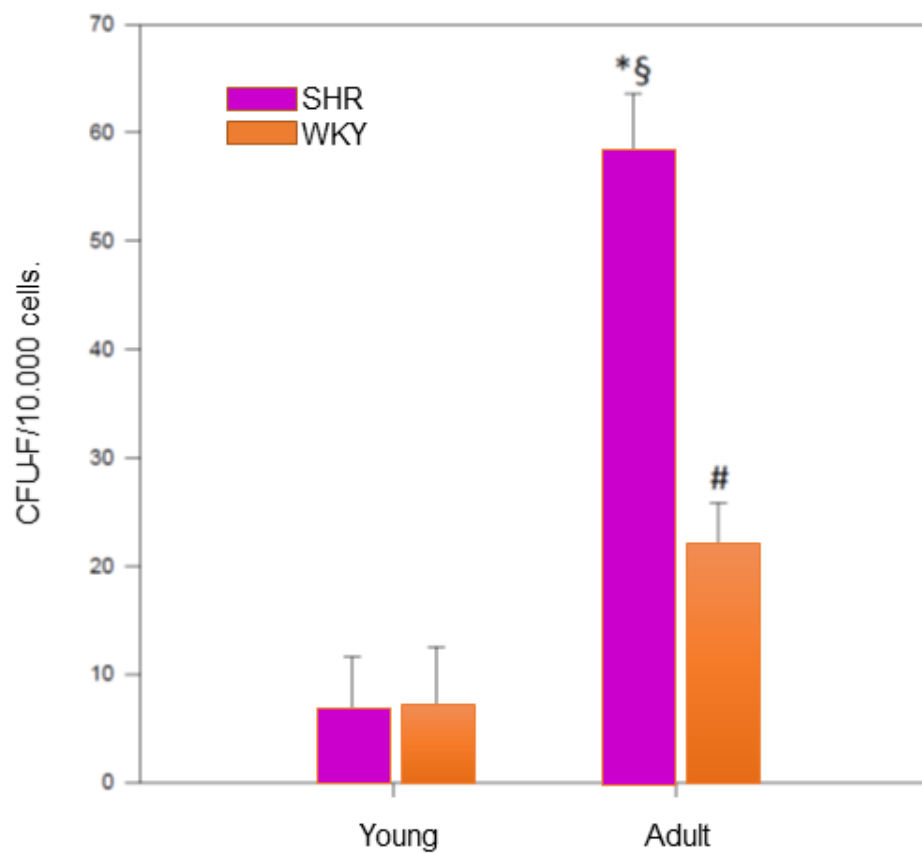
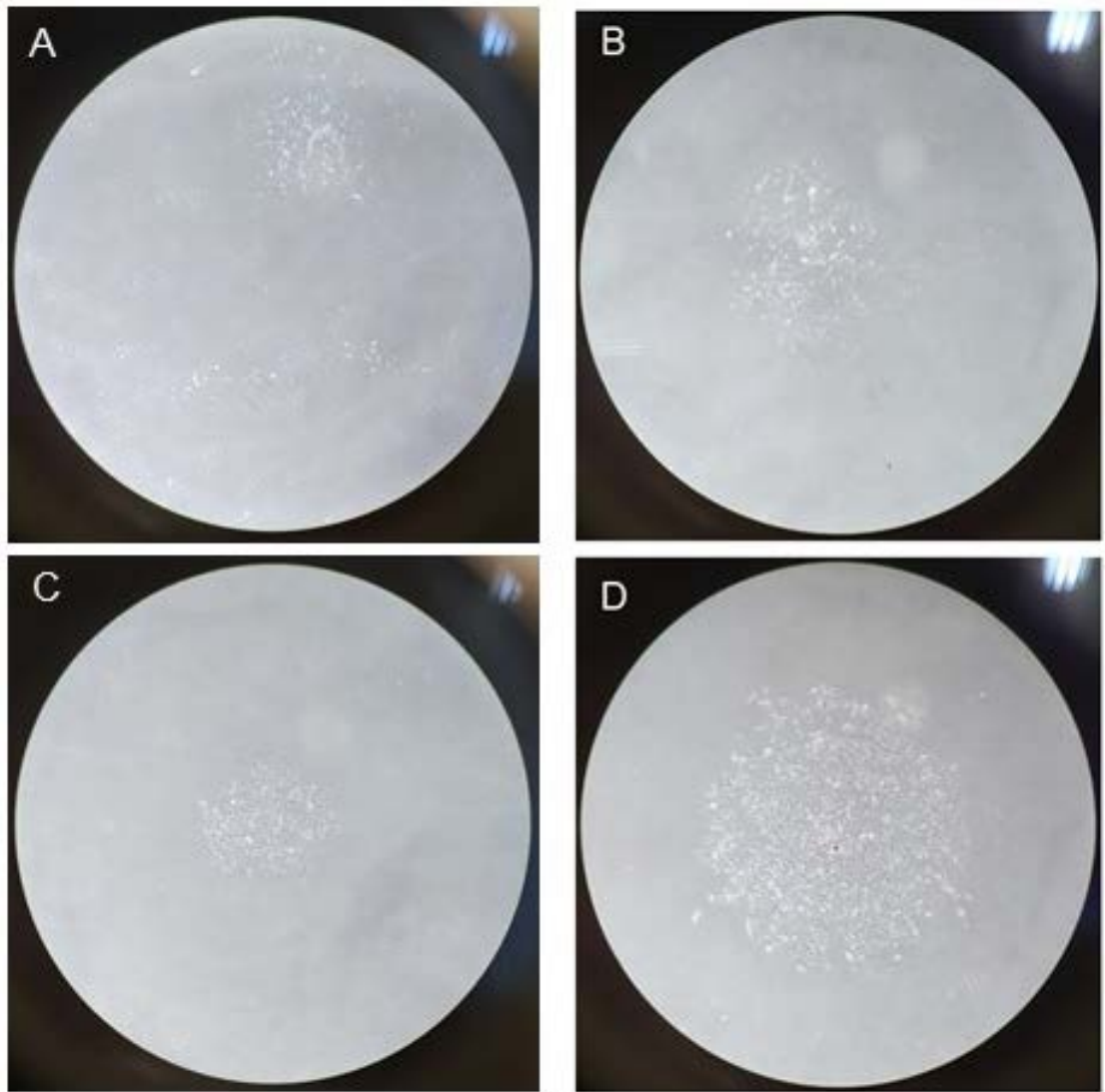


Figure 5: Mean values (\pm standard error) of the number of renal mesenchymal stem cells (rMSC), expressed as colony-forming units similar to fibroblasts (CFU-F) per 10.000 cells cultured from the kidneys of young and adult SHR and WKY animals. Note the higher number of rMSCs in adult SHRs compared to the other groups. (* p <0.05 versus adult WKY group; §p <0.05 versus young SHR; #p <0.05 versus young WKY).



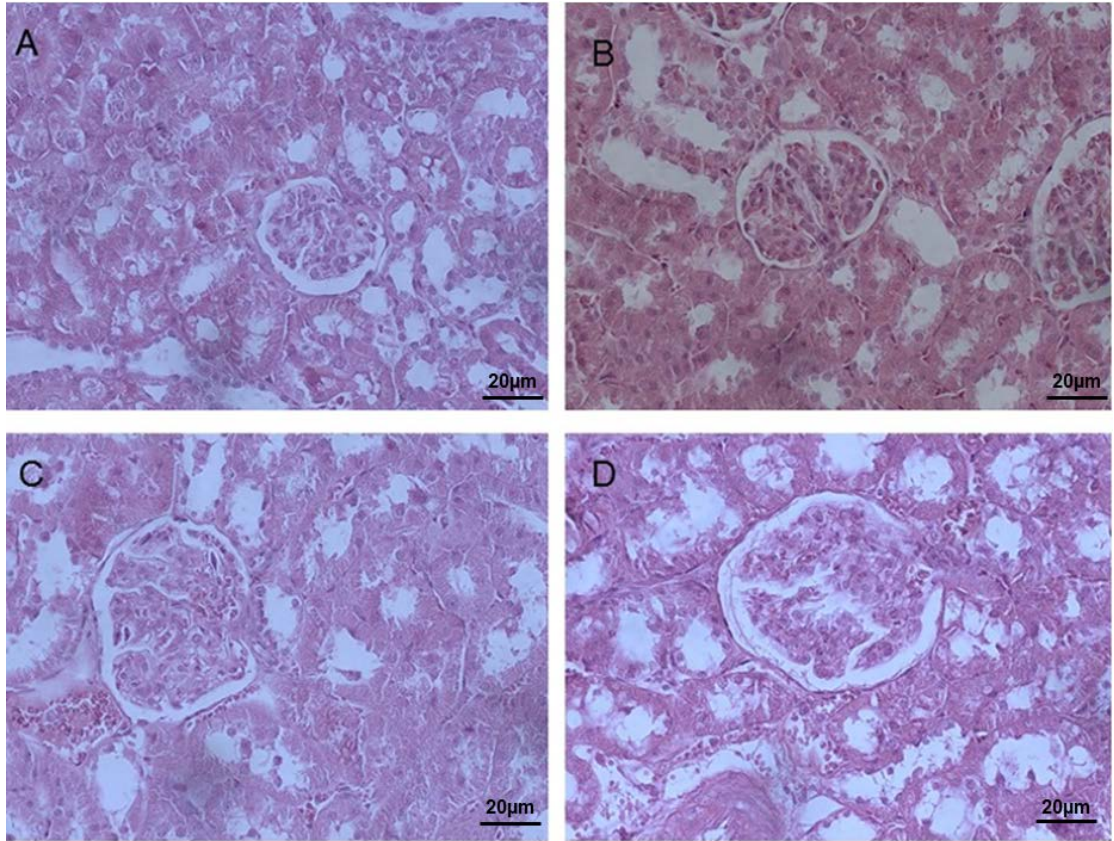
Source: Author, 2020.

Figure 6 - Microscopic view (4X magnification) of culture plates corresponding to the CFU-Fs assays of young animals SHR (figure A) and WKY (figure B), and adult animals SHR (figure C) and WKY (figure D).



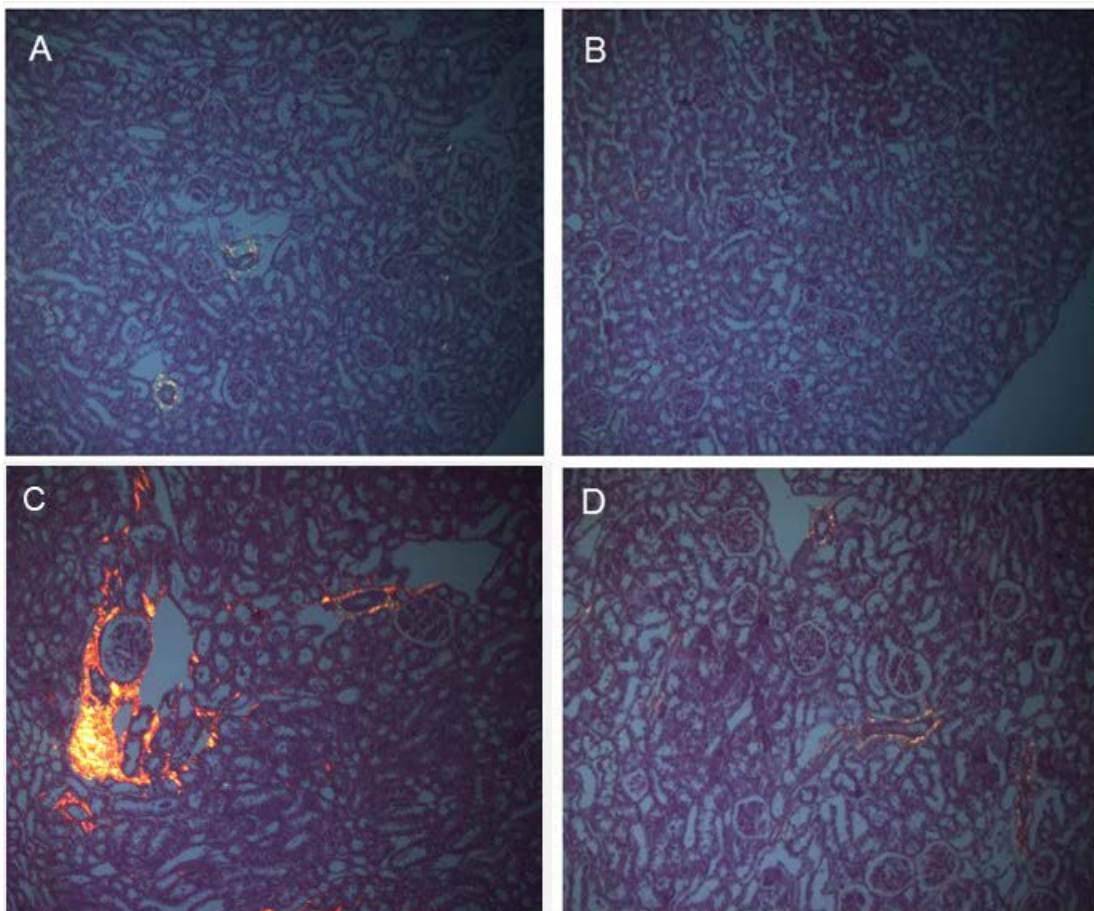
Source: Author, 2020.

Figure 7: Light photomicrographs of renal histological sections stained with hematoxylin-eosin showing the microscopic renal morphology in the young SHRs (figure A) and WKY (figure B), and in the adult SHR (figure C) and WKY (figure D) animals.

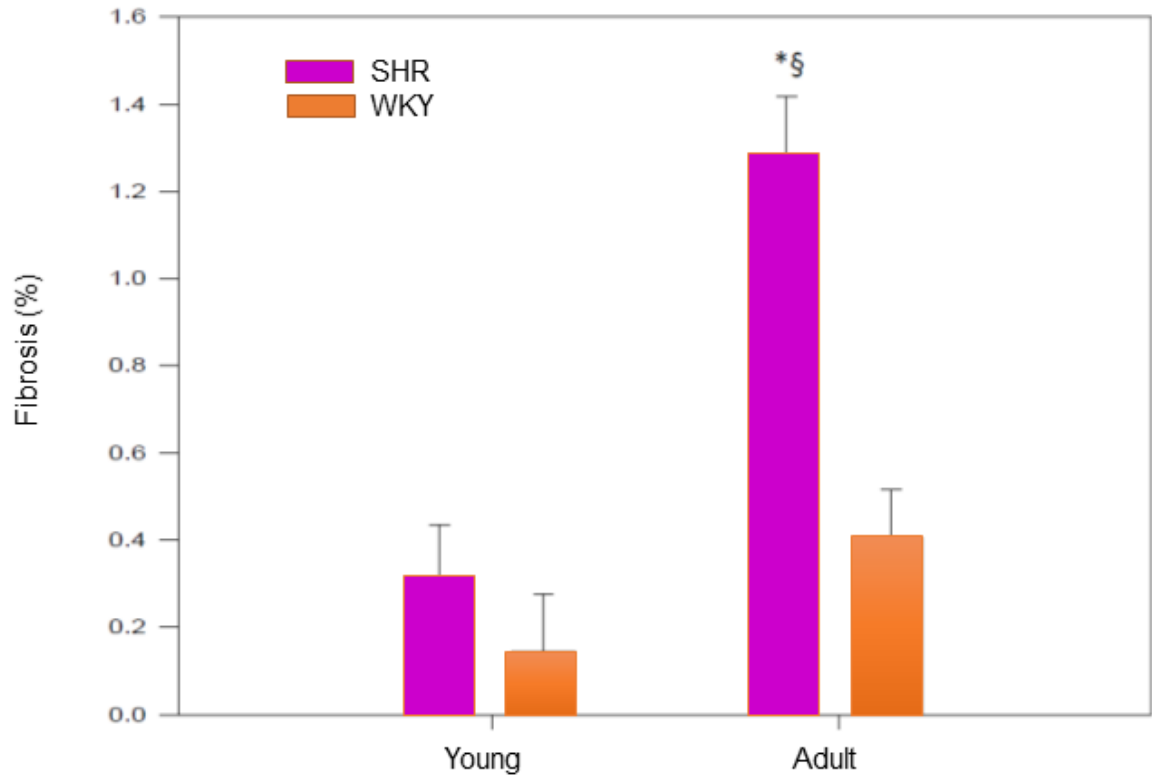


Source: Author, 2020.

Figure 8: Polarized light photomicrographs of renal histological sections stained with Picro Sirius Red (10X magnification) showing the degree of renal fibrosis are shown in the upper panel, in young SHRs and WKY animals (figures A and B) and in adult SHR and WKY animals (figure C and D), respectively. The mean values (\pm standard error) of fibrosis are shown in the lower panel (* $p < 0.05$ versus adult WKY group; § $p < 0.05$ versus young SHR; # $p < 0.05$ versus young WKY).

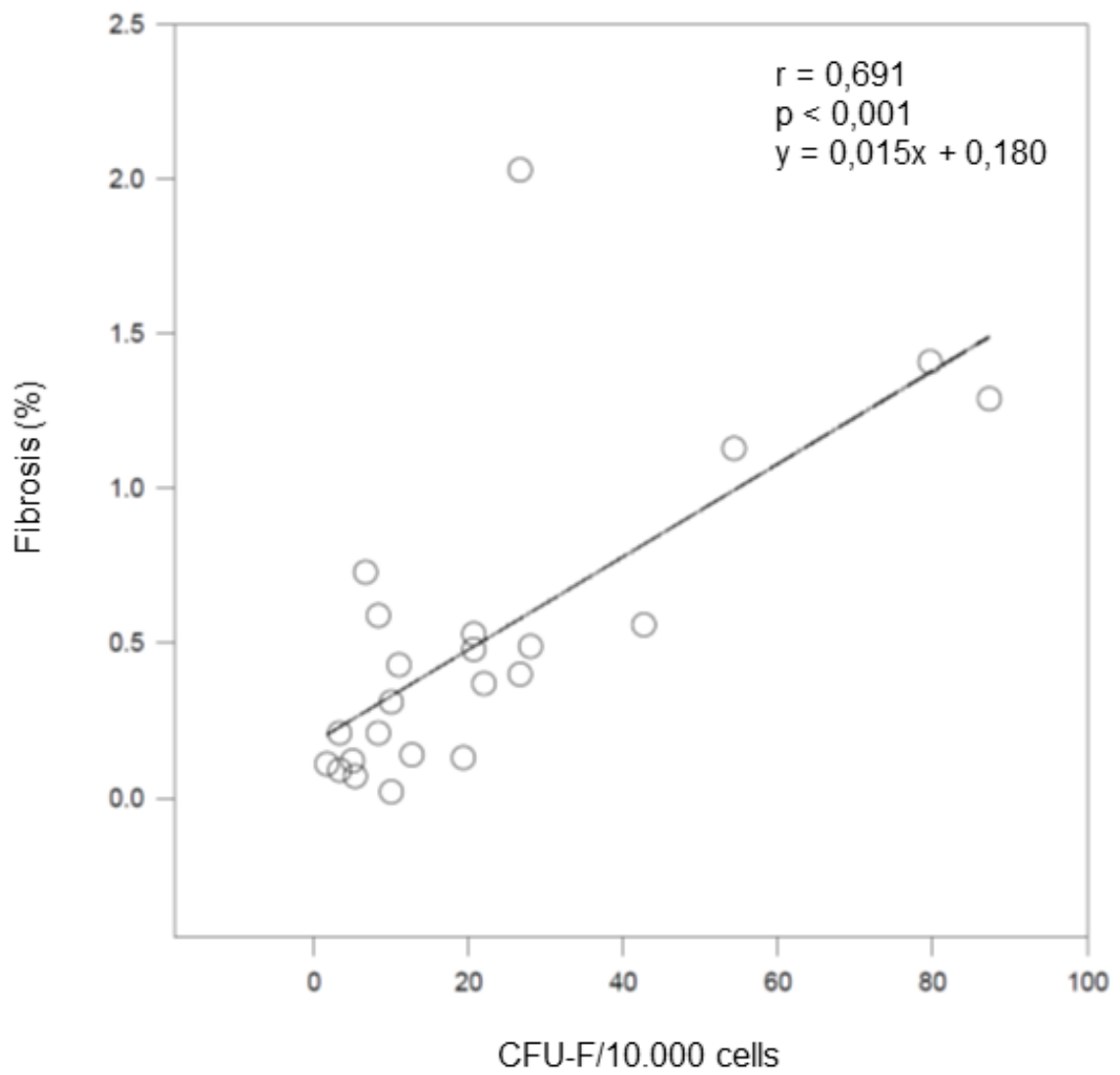


Source: Author, 2020.



Source: Author, 2020.

Figure 9: Correlation between the number of quantified CFU-Fs and the percentage of fibrosis in the kidneys of the animals studied in the 04 experimental groups. Note the significant positive linear correlation between the two parameters.



Source: Author, 2020.

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

Abdolmohammadia K, Pakdelb FD, Aghaeib H, Assadiasl S, Fatahie Y, Rouzbahani NH, Rezaieமானeshg A, Soleimanic, Tayebii L, Nicknamb MH. Ankylosing spondylitis and mesenchymal stromal/stem cell therapy: a new therapeutic approach. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 28 out 2018; 109:1196–1205.

Ahluwalia M, Bangalore S. Management of hypertension in 2017: targets and therapies. *Curr Opin Cardio*. 2017; 32(1):01-09.

Biancardi VC, Bomfim GF, Reis WL, Al-Gassimi S, Nunes KP. The interplay between Angiotensin II, TLR4 and hypertension. *Pharmacological Research*. 17 mar 2017.

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001; 105:829-41.

Brasil. Ministério da Saúde. Hipertensão Arterial Sistêmica. Brasília: Caderno de Atenção Básica nº15, 2006. P. 58. Disponível em: <http://dab.saude.gov.br/docs/publicacoes/cadernos_ab/abcd15.pdf>. Acesso em: 01 fev 2017.

Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LM; Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 22 abr 2009; 31.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cell*. 26 jul 2007; (25):2739–2749.

Chen J, Kang JG, Keyvanfar K, Young NS, Hwang PM. Long-term adaptation to hypoxia preserves hematopoietic stem cell function. *Exp Hematol*. 2016; 44(9):866-873.

Daley GQ. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Phil. Trans. R. Soc*. 2015; 370 (1680).

Dekel B, Zangi L, Shezen E, Reich-Zeliger S, Eventov-Friedman S, Katchman H, Jacob-Hirsch J, Amariglio N†, Rechavi G, Margalit R†, Reiner Y. Isolation and Characterization of Nontubular Sca-1⁺Lin⁻ Multipotent Stem/Progenitor Cells from Adult Mouse Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*. 30 ago 2006; 17:3300-3314.

Dia Mundial de Hipertensão 2016. Representação da Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS). Disponível em: https://www.paho.org/bireme/index.php?option=com_content&view=article&id=330:dia-mundial-da-hipertensao-2016&Itemid=183&lang=pt. Acesso em: 12 fev 2017.

Drew RC, Charkoudian N, Park J. Neural control of cardiovascular function in Black adults: implications for racial differences in autonomic regulation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. Boston: 12 dez 2019.

Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkwicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. 22 jul 2015; 62(3):329-337.

Fazan Junior R, Silva VJ, Salgado HC. Modelos de hipertensão arterial. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 20 jan 2001; 8:19-29.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 4 set 1976; 5:267-74.

Geleilate TJM, Cardoso MCM, Coelho EB, Nobre F. Quando suspeitar de hipertensão arterial sistêmica secundária e como investigar as principais causas. *Rev Bras Hipertensão*. Out/dez. 2000; 7(4): 396-398.

Grassi G, Mark A, Esler M. The Sympathetic Nervous System Alterations in Human Hypertension. *Journal of the American Heart Association*. Jan 2015; 116:976-990.

Gunalan S, Somarathinam K, Bhattacharya J, Srinivasan S, Jaimohan SM, Manoharan R, Ramachandran S, Kanagaraj S, Kothandan G. Understanding the dual mechanism of bioactive peptides targeting the enzymes involved in Renin Angiotensin System (RAS): An In-Silico Approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 22 nov 2019.

Hall JE, Carmo DJ, Silva DA, Wang Z, Hall ME. Obesity-induced Hypertension: Interaction of Neurohumoral and Renal Mechanisms. *Journal of the American Heart Association*. Jan. 2015; 116:991-1006.

Harrison DG. The immune system in hypertension. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2014; 125:130-140.

Huang X, Ding J, Li Y, Liu W, Ji J, Wang H, Wang X. Exosomes Derived from PEDF Modified Adipose derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Regulation of Autophagy and Apoptosis. *Experimental Cell Research*. 18 ago 2018.

Kang M, Youg-Mahn H. Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Nephron Progenitor Cells in a Serum and Feeder Free System. *PLOS ONE*. Abr. 2014; 9(4).

Kelly SJ. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage blastomeres. *J. Exp. Zool*. 1977; 200:365–376.

Kern S, Eichler H, STOEVE J, KLUTER H, BIEBACK K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. 12 jan 2006; 24:1294 –1301.

Khawaja Z, Wilcox CS. Role of the Kidneys in Resistant Hypertension. *International Journal of Hypertension*. 13 jan 2011.

Kurlak LO, Pipkin FB, Mohaupt MG, Mistry HD. Responses of the renin–angiotensin–aldosterone system in pregnant chronic kidney disease patients with and without superimposed pre-eclampsia. *Clinical Kidney Journal*. 15 fev 2019.

Leung AA et al. Hypertension Canada's 2017 Guidelines for Diagnosis, Risk Assessment, Prevention, and Treatment of Hypertension in Adults. *Canadian Journal of Cardiology*. 5 mar 2017; 33(1):557-576.

Lira, RC. Transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea em ratos com hipertensão renovascular. 2017. 113 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Liu X, Zhou L, Chen X, Liu T, Pan G, Cui W, Li M, Luo ZP, Pei M, Yang H, Gong Y, He F. Culturing on decellularized extracellular matrix enhances antioxidant properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering C*. 30 dez 2015.

Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, Harrison DG. Interleukin 17 Promotes Angiotensin II–Induced Hypertension and Vascular Dysfunction. *Hypertension*. 28 dez 2009; 55(2):500-507.

Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, Harrison DG. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*. Fev 2010; 55 (2): 500.

Marofi, F, Vahedi G, Biglari A, Esmaeilzadeh A, Athari, SS. Mesenchymal stromal/stem cells: A new era in the cell-based targeted gene therapy of cancer. *Frontiers in Immunology*. 18 dez 2017; 8(1770).

Marofi F, Vahedi G, Hasanzadeh A, Salarinasab S, Arzhanga P, Khademi B, Hagh MF. *J Cell Physiol*. Mesenchymal stem cells as the game-changing tools in the treatment of various organs disorders: Mirage or reality? 5 jul 2018; 234(2):1268-1288.

McCarthy, CG, Goulopoulou S, Wenceslau CF, Spitler K, Matsumoto T, Webb RC. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. *American Journal of Physiology*. 25 out 2013; 306(2):184-196.

Mendes GS, Moraes CF, Gomes L. Prevalência de hipertensão arterial sistêmica em idosos no Brasil entre 2006 e 2010. *Revista Brasileira de medicina de família e comunidade*. Set 2014; 9(32):273-278.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 02 abr 1999; 284(5411):143-147.

Reinders ME, Fibbe WE, Rabelink TJ. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 26 out 2009.

Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadi S, Aval FS. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Medica Iranica*. 2017; 55(1).

Sohn SJ, Yu JM, Lee EY, Nam YJ, Kim J, Kang S, Kim DH, Kim A, Kang SI. Anti-aging Properties of Conditioned Media of Epidermal Progenitor Cells Derived from Mesenchymal Stem Cells. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2 mar 2018.

Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotso M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol*. Jul 2014; 4(3):1201-28.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 30 nov 2007;131(5):861-72.

Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014; 15(11):1009-1016.

Wu J, Saleh MA, Kirabo A, Itani HA, Montaniel KRC, Xiao L, Chen W, Mernaugh RL, Cai H, Bernstein KE, Goronzy JJ, Weyand CM, Curci JA, Barbaro NR, Moreno H, Davies SS, Roberts II LJ, Madhur MS, Harrison DG. Immune activation caused by vascular oxidation promotes fibrosis and hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*. Apr 2016; 126(1):50–67.

Zhang W, Liu L, Huo Y, Yang Y, Wang Y. Hypoxia-Pretreated Human MSCs Attenuate Acute Kidney Injury through Enhanced Angiogenic and Antioxidative Capacities. *BioMed Research International*. 16 Jul 2014.

Zhao L, Hu C, Zhang P, Jianh H, Chen J. Preconditioning strategies for improving the survival rate and paracrine ability of mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *J Cell Mol Med*. 27 out 2018.

SEÇÃO C – CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Thais Soares Farnesi de Assunção

Auxílio na elaboração, organização e execução de experimentos, em especial cultura de células.

Dôuglas Caixeta Nunes

Auxílio na execução de experimentos, em especial cultura de células.

Lucas Felipe de Oliveira

Auxílio na execução de experimentos, em especial citometria de fluxo e análise dos dados.