Michele Andrade de Barros

**Análise comparativa do potencial de migração de células-tronco
imaturas de polpa dentária humana em ratos induzidos a necrose
tubular aguda utilizando as vias: intraperitoneal e endovenosa**

São Paulo

2011

Michele Andrade de Barros

**Análise comparativa do potencial de migração de células-tronco
imaturas de polpa dentária humana em ratos induzidos a necrose
tubular aguda utilizando as vias: intraperitoneal e endovenosa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Irina Kerkis

São Paulo

2011

Michele Andrade de Barros

**Análise comparativa do potencial de migração de células-tronco
imaturas de polpa dentária humana em ratos induzidos a necrose
tubular aguda utilizando as vias: intraperitoneal e endovenosa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Irina Kerkis

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

a biblioteca não se responsabiliza por quaisquer
erros de normalização

Conferido Somente Ficha
Catalográfica

04.03.11

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2431
FMVZ

Barros, Michele Andrade de

Análise comparativa do potencial de migração de células-tronco imaturas de
polpa dentária humana em ratos induzidos a necrose tubular aguda utilizando as vias:
intraperitoneal e endovenosa / Michele Andrade de Barros. -- 2011.
81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profª. Dra. Içina Kerkis.

1. Célula tronco mesenquimal. 2. Necrose tubular aguda. 3. Rim. 4. Lesão renal
aguda. 5. Rato. I. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **112** nas fls. **92** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Niels Olsen Saraiva Câmara, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Utilização de células tronco mesenquimais derivadas de poupa dentária humana no tratamento de doença renal aguda induzida em ratos** do qual participam o(s) alunos **Michele Andrade de Barros e a pesquisadora Irina Kerkis**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **21.09.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 22 de setembro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRICIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BARROS, Michele Andrade

Título: Análise comparativa do potencial de migração de células-tronco imaturas de polpa dentária humana em ratos induzidos a necrose tubular aguda utilizando as vias: intraperitoneal e endovenosa.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

RESUMO

BARROS, M. A. **Análise comparativa do potencial de migração de células-tronco imaturas de polpa dentária humana em ratos induzidos a necrose tubular aguda utilizando as vias:** intraperitoneal e endovenosa. [Comparative analysis of the potential for migration of immature stem cells from human dental pulp in rats induced acute tubular necrosis using routes: intraperitoneal and intravenous]. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Pesquisas com células tronco têm demonstrado que essa alternativa terapêutica tem grande potencial em diversas patologias. Contudo, muito ainda precisa ser elucidado quanto aos mecanismos de ação, dose e melhores vias de aplicação, para que essa alternativa terapêutica seja efetivamente incorporada às outras. Neste contexto, a via de aplicação se torna crucial na efetividade do tratamento. O objetivo do presente estudo foi avaliar no modelo de necrose tubular aguda (NTA) induzido pelo glicerol o potencial de migração das células tronco mesenquimais derivadas de polpa dentária humana, utilizando as vias intraperitoneal e a via intravenosa. Os nossos resultados demonstraram que neste modelo, não há diferença na migração das células para o órgão alvo, o rim. Contudo, a via intravenosa proporcionou uma melhora da função renal mais significativa do que quando comparada a via intraperitoneal.

Palavras-chave: rim, necrose tubular aguda, glicerol, rato, lesão renal aguda.

ABSTRACT

BARROS, M. A. Comparative analysis of the potential for migration of immature stem cells from human dental pulp in rats induced acute tubular necrosis using routes: intraperitoneal and intravenous. [Análise comparativa do potencial de migração de células-tronco imaturas de polpa dentária humana em ratos induzidos a necrose tubular aguda utilizando as vias: intraperitoneal e endovenosa]. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Stem cell research have demonstrated that this alternative therapy has great potential in various diseases. However, much remains to be elucidated about the mechanisms of action, dosage and best means of implementation, so that alternative therapy may be incorporated other. In this context, the route of application becomes crucial in the effectiveness of treatment. The aim of this study was to evaluate the model of acute tubular necrosis (NTA) induced by glycerol the potential for migration of mesenchymal stem cells derived from human dental pulp, using the intraperitoneal and intravenous route. Our results demonstrate that this model, there is no difference in cell migration to the target organ, the kidney. However, the intravenous route provided an improvement in renal function more significantly than when compared to the intraperitoneal route.

Keywords: kidney, acute tubular necrosis, glycerol, rat, acute kidney injury.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Necrose Tubular Aguda (NTA)	13
2.2 Necrose Tubular Aguda (NTA) induzida pelo Glicerol	14
2.3 Prevalência da LRA	15
3 CÉLULAS TRONCO	16
3.1 Plasticidade das CT	16
3.2 Classificação das CT	16
3.3 Células Tronco Embrionárias (CTe)	17
3.4 Células Tronco Adultas (CTa)	17
3.5 Células Tronco Mesenquimais (CTm)	18
3.5.1 <i>Propriedade Imunomodulatória</i>	18
3.5.2 <i>Capacidade de Migração “Homing”</i>	19
3.5.3 <i>Engrefment (CTm)</i>	21
3.6 Nichos de CT	21
3.7 Terapia com CT em modelos de LRA	22
3.8 Vias de Aplicação	23
4 OBJETIVOS	25
4.1 Objetivos Específicos	26
5 MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1 Estudo in vitro	28
5.1.1 <i>Caracterização das CT In Vitro</i>	28
5.1.2 <i>Processo descongelamento das CTIPD-5</i>	28
5.1.3 <i>Caracterização das CTIPD-5 por imunofluorescência</i>	29
5.1.4 <i>Caracterização in vitro das CTIPD-5 por Citometria de Fluxo</i>	30
5.1.5 <i>Marcação celular com anticorpos primário e secundário</i>	31
5.1.6 <i>Leitura das CTIPD-5 por Citometria de Fluxo</i>	31
5.1.7 <i>Curva de crescimento das CTIPD-5 pós- criopreservação</i>	31

5.1.8 Diferenciação osteogênica	32
5.1.9 Diferenciação adipogênica	33
5.1.10 Diferenciação condrogênica	33
5.2.1 Modelo Experimental Proposto e Metodologia	34
5.2.2 Análise da Creatinina Plasmática	36
5.2.3 Rastreamento e análise das CTIPD-5 por Citometria de Fluxo	36
5.2.4 Preparo da amostra para Citometria de Fluxo	37
5.2.5 Marcação celular com anticorpos primários e secundários	37
5.2.6 Leitura no Citômetro de Fluxo FACSCalibur	38
5.3 Avaliação histológica: Preparo do tecido renal	39
5.3.1 Técnica Histológica (HE)	40
5.3.2 Técnica de Imunohistoquímica	40
5.3.1 Técnica para Microscopia Confocal	41
5.4 Análises Estatísticas	42
6 RESULTADOS	43
6.1 Curva de crescimento após criopreservação	44
6.2 Caracterização das CTIPD-5 por Citometria de Fluxo	44
6.3 Diferenciação in vitro: Osteogênica, condrogênica e adipogênica	45
7 RESULTADO	48
7.1 Análise Histológica (HE)	49
7.2 Marcação das CTIPD-5 com Vybrant	54
7.3 Marcação as CTIPD-5 por imunohistoquímica	56
7.4 Marcação das CTIPD-5 por Citometria de Fluxo	59
8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
9 DISCUSSÃO	69
10 CONCLUSÕES	72
11 REFERÊNCIAS	74

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos um novo campo de pesquisa denominado terapia celular tem atraído à atenção da comunidade científica devido as perspectivas futuras para o tratamento de doenças até então sem cura aparente. Este tem como base fundamental as células tronco, as quais apresentam propriedades específicas como a capacidade de auto-renovação, diferenciação em diversos tipos celulares (CAPLAN, 2002), ação antiapoptótica, pró-angiogênica e efeito reparador endógeno (GNECCHI et al., 2008).

Embora resultados promissores em diversas patologias venham sendo publicados na terapêutica com células-tronco, existem lacunas no conhecimento científico sobre os mecanismos de ação, dose e melhores vias de aplicação e, para que essa alternativa terapêutica seja efetivamente incorporada às outras, essas variáveis precisam ser exploradas.

Na medicina veterinária, a Lesão Renal Aguda (LRA) tem o seu diagnóstico estabelecido em menor frequência quando comparada a Doença Renal Crônica (DRC), no entanto, a severidade da mesma lhe confere um prognóstico reservado à grave, a menos que o processo mórbido subjacente possa ser rapidamente revertido (WINGFIELD, 2004).

A despeito do que ocorre na medicina veterinária, em humanos, a LRA é considerada uma doença de pacientes hospitalizados e possui uma taxa de mortalidade de 37,1 % e 78,6 % quando hospitalizados ou em unidades de terapia intensiva (UTI), respectivamente (NAMITA GILL, 2005).

Diante desses dados, o presente estudo fornece motivos substanciais à busca de uma nova alternativa terapêutica, vez que o modelo nefrotóxico de LRA proposto, contribui cientificamente de forma simultânea na medicina humana e veterinária, visto que o modelo mimetiza a patologia Rabdomiólise de ocorrência humana e a miopatia de esforço de ocorrência em pacientes animais.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Por definição, a LRA se caracteriza por uma síndrome clínica associada à redução aguda da função renal em horas ou dias e se caracteriza pelo aparecimento súbito de insuficiência hemodinâmica de filtração e excreção renal (BIRCHARD et al., 2003; ETTINGER; FELDEMAN, 2004; NELSON; COUTO, 2006).

De caráter etiológico multifatorial, esta síndrome é classificada em pré-renal, renal ou pós-renal, dependendo da origem funcional, extensão e duração das condições que a incite (THADINI et al., 1996; ETTINGER; FELDEMAN, 2004).

A evolução desta síndrome pode ser caracterizada por três fases: a de iniciação, a manutenção e a fase de recuperação. O reparo das células lesadas dependerá da remoção e do repovoamento do epitélio tubular contíguo. A recuperação estrutural e morfológica deve ocorrer mesmo com a insuficiência funcional e a uremia em curso. Já a recuperação celular é sustentada por vários hormônios, cujas atividades são induzidas pela lesão celular (ETTINGER; FELDEMAN, 2004; NELSON; COUTO, 2006).

Na fase de iniciação, existe a agressão renal com subsequente lesão parenquimatosa e epitelial tubular, se essa agressão se mantiver, ocorre morte celular. Essa fase pode perdurar horas ou dias, no entanto, ela não é identificada porque as alterações na taxa de filtração glomerular (TFG) e na densidade urinária não são perceptíveis clinicamente. A intervenção terapêutica nesta fase é importante, pois pode evitar a progressão da lesão (ETTINGER; FELDEMAN, 2004).

A fase de manutenção é caracterizada pelo estabelecimento de lesões tubulares irreversíveis e a eliminação dos fatores incitantes neste estágio não permite a recuperação do órgão. A sua duração pode persistir por semanas e o prolongamento desta fase aumenta a chance de uma recuperação mais lenta além de poder acarretar em disfunção permanente (ETTINGER; FELDEMAN, 2004).

Na fase de recuperação, embora novos néfrons não possam ser reproduzidos e os néfrons lesados não possam ser reparados, a hipertrofia funcional dos néfrons sobreviventes, pode compensar de forma adequada a diminuição do número de néfrons, sendo isto possível somente se houver células epiteliais viáveis e a membrana basal tubular

estiver intacta. Deste modo, mesmo que a recuperação renal funcional for incompleta, pode ser estabelecido um bom funcionamento renal (ETTINGER; FELDEMAN, 2004; NELSON; COUTO, 2006).

2.1 Necrose Tubular Aguda (NTA)

A necrose tubular aguda (NTA) é umas das alterações estruturais mais comuns associadas ao desenvolvimento da insuficiência renal aguda e se caracteriza por ocasionar lesão às células dos túbulos renais de forma aguda resultante de isquemia renal ou por exposição a materiais nefrotóxicos (ETTINGER; FELDEMAN, 2004; NELSON; COUTO, 2006).

A nefrotoxicidade pode ser induzida por agentes endógenos ou exógenos e ocorre pela existência de um rico suprimento sanguíneo renal que culmina em aumento da liberação de toxinas por filtração e exposição ao epitélio tubular. Associado a isso, os mecanismos de concentração urinária e de contracorrente concentram as toxinas no interior do interstício e do lúmen tubular e favorece que a lesão renal se instale nos túbulos proximais (ETTINGER; FELDEMAN, 2004).

As nefrotóxicas exógenas são os antibióticos, metais pesados, contrastes radiográficos, solventes orgânicos, venenos, químicos, anestésicos, antiinflamatórios não esteróides (DAINES) e as endógenas são (mioglobina hemoglobina, deposição tubular de cálcio, ácido úrico e oxalato (ETTINGER; FELDEMAN, 2004).

A mioglobina possui um mecanismo de nefrotoxicidade obscuro, porém parece estar associada à vasoconstrição renal, aliada à hipovolemia e acidose, provocando uma diminuição do aporte de oxigênio ao rim (DON et al., 1996). Outro fator a ser considerado é a reperfusão pós-lesão muscular, que culmina na liberação de radicais livres e pode lesar ainda mais um rim já isquêmico (ODEH, 1991).

As causas de mioglobinúria podem ser divididas em traumáticas (traumas, pós-exercícios, isquemia e pós-convulsões) e não traumáticas (miopatias, coma prolongado, hiperpirexia, infecções, distúrbios metabólicos, sobrecarga de drogas e toxinas: narcóticos, sedativos, álcool, distúrbios eletrolíticos, veneno crotálico e experimentalmente, o glicerol), sendo que um terço dos pacientes mioglobinúricos pode desenvolver LRA (DON et al., 1996).

Exemplos de patologias que causam mioglobinúria na medicina veterinária são acidentes por animais peçonhentos, em especial os crotálicos que respondem a 10% dos acidentes ofídicos com presença de letalidade em 3,3%. Várias causas de miosite e a miopatia de esforço que ocorre em animais atletas ou submetidos a esforço muscular intenso. Em humanos a forma mais comum de mioglobinúria é a rabdomiólise, que possui etiologia multifatorial (DON et al., 1996).

2.2 Necrose Tubular Aguda (NTA) induzida pelo Glicerol

Dentre os agentes nefrotóxicos, o glicerol conhecido também como 1,2,3 propanotriol, tem sido muito utilizado na medicina como um precursor do modelo experimental de necrose tubular aguda (NTA) induzida em ratos ou camundongos por mimetizar a Rabdomiólise em humanos.

Na LRA induzida pelo glicerol, os túbulos contorcidos proximais (TCP) apresentam histologicamente uma extensa necrose tubular aguda, caracterizada por células necróticas, presença de cilindros mioglobinúricos ao longo dos túbulos, células necróticas descamadas na luz do túbulo, células com aspecto regenerativo, aumento da acidofilia citoplasmática com picnose e cariólise de núcleos, vasoconstricção glomerular e infiltração de leucócitos mononucleares (HOMSI, 2006).

Segundo Homsí (2006), neste modelo não há alteração glomerular e os túbulos contorcidos distais (TCD) apresentam moderado comprometimento, caracterizado principalmente por aplainamento do epitélio de revestimento e dilatação da luz.

As características físico-químicas do glicerol permitem que ao ser introduzido na musculatura estriada esquelética cause necrose (NAMITA GILL, 2005). A miólise proveniente da necrose muscular libera mioglobina que promove obstrução tubular pela presença de cilindros formados pelo pigmento heme, vasoconstricção renal e toxicidade direta da proteína heme sobre a célula tubular. Além disso, um distúrbio oxidativo ocorre pela alteração na homeostase do cálcio, depleção de ATP (Adenosina Trifosfato) e ativação de sistemas enzimáticos como proteases e fosfolipases, que irão participar da formação e

liberação de radicais livres, resultando em lesão celular (NAMITA GILL, 2005).

Esse estresse oxidativo altera a estrutura e função glomerular por efeito das espécies reativas de oxigênio (EROs) em células mesangias e endoteliais, desencadeando lesão inflamatória causada pela liberação de mediadores como as citocinas TNF, IL1, além da ativação leucocitária e uma redução de óxido nítrico (NO) implicando no relaxamento vascular e na ativação da peroxidação lipídica, agravando ainda mais a NTA (NAMITA GILL, 2005).

2.3 Prevalência da LRA

A LRA possui altas taxas de mortalidade tanto na medicina veterinária como na humana, tendo como fator freqüente a necrose tubular aguda (NTA). Em humanos, esse tipo de lesão é responsável por 70% dos casos, seguida da incidência de 10 a 20% de nefrites intersticiais agudas e de 1 a 10% pelas demais causas (FOTINO et al., 1983; BREZIS et al., 1991; GILLIUM et al., 1991; MINDELL et al., 1997).

No campo veterinário, um estudo realizado por Vaden et al. (1998), revelaram que de 99 casos de LRA em cães ocasionada por diversas etiologias, 60% vieram a óbito por morte natural ou eutanásia e cerca de 60% dos sobreviventes desenvolveram doença renal crônica (DRC) com recuperação da função renal em apenas 44%.

Dentre as causas de LRA, particularmente a Leptospirose, tem maior incidência em meses com alto índice pluviométrico (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidade de São Paulo – FMVZ / 1983 a 1985).

A exemplo de pacientes humanos, a NTA também é a forma mais comum de LRA em animais, tendo como etiologia principal agentes nefrotóxicos (20 – 25% dos casos de LRA) e fatores que causem isquemia renal (FORRESTER, 2003).

3 CÉLULAS TRONCO (CT)

Células tronco são células primordiais indiferenciadas. Didaticamente são divididas em Células Tronco embrionárias e pluripotentes (CTe) e Células Tronco adultas (CTa). Respectivamente, apresentam capacidade de auto renovação encontradas em tecidos embrionários e adultos e são responsáveis pela formação do embrião e pela manutenção dos tecidos na fase adulta (RICARDO et al., 2005; ANGLANI et al., 2004).

Segundo Caplan (2000) a capacidade de auto renovar-se confere às Células Tronco o poder se diferenciar em diversos tipos celulares quando reintroduzidas no organismo e adquirir a funcionalidade de qualquer tecido, apresentando assim, forte potencial em processos de regeneração tecidual.

3.1 Plasticidade das CT

Plasticidade celular refere-se à capacidade que as células tronco (CT) têm em atravessar barreiras de linhagens celulares e adotar um perfil de expressão gênica, funcional e fenotípica, culminando em diversos tipos celulares (VERFAILLIE, 2005).

3.2 Classificação das CT

As CT podem ser classificadas em: Totipotentes, Pluripotentes, Multipotentes e Unipotentes. O que determina a classificação das CT é a capacidade de diferenciação. As CT Totipotentes, consideradas células mestre do corpo, carregam informações necessárias para dar origem a todos os tecidos, inclusive placenta e anexos embrionários. As CT Pluripotentes têm capacidade de originar os 3 folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma), ou seja, qualquer célula do organismo adulto, não sendo capazes de gerar um novo indivíduo. As CT Multipotentes, podem originar 4 ou mais linhagens de células e as CT

Unipotentes são capazes de se diferenciar em um único tecido (SCHENA et al., 2003; YOUNG et al., 2004).

3.3 Células Tronco Embrionárias (CTe)

As células tronco embrionárias podem ser derivadas do zigoto ou da massa interna do blastocisto, uma esfera com aproximadamente 100 células. Quando derivadas do zigoto, apresentam características Totipotentes, pois são capazes de se diferenciar em tecidos extraembrionários e nos 3 folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma). As CTe oriundas da parte interna do blastocisto, são classificadas como Pluripotentes, pois se diferenciam apenas nos 3 folhetos embrionários.

3.4 Células Tronco Adultas (CTa)

As células tronco adultas (CTa) são obtidas de vários tecidos como medula óssea, pele, músculo, tecido adiposo (ZUK et al., 2002), polpa dentária (KERKIS et al., 2006) dentre outros.

Uma das características das CTa é a sua capacidade de migrar em diferentes locais em direção a lesão, possibilitando o enxerto destas células.

Classificadas como multipotentes, apresentam capacidade limitada de diferenciação em tecidos celulares. Contudo, após estudos subseqüentes demonstrando que essas células possuíam capacidade de se diferenciar em tecidos mesodermis, Caplan (2001), introduziu de um novo termo para essas células, nomeando-as como Células Tronco mesenquimais (CTm).

As CTa são divididas em Células Tronco hematopoiéticas (CTh) e Célula Tronco Mesenquimais (CTm). As CTh podem ser encontradas na medula óssea (MO), no cordão umbilical e em pouca quantidade no sangue periférico. Para serem consideradas CTh,

precisam expressar as proteínas de superfície de membrana: CD34, CD117, CD133 e Sca 1 e serem negativas para: CD44, CD73, CD90 e CD115 (HERRERA et al, 2006).

3.5 Células Tronco Mesenquimais (CTm)

De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy) as CTm humanas precisam seguir três critérios básicos para serem definidas como tal, sendo: (1) plásticas-aderentes caso mantidas em condições básicas de cultura; (2) positivas para CD105, CD73 e CD90 e negativas para CD45, CD34, CD14, CD11b, CD 79a ou CD19 e HLA-DR; além de, (3) serem capazes de se diferenciar em fibroblastos, osteoblastos, adipócitos e condroblastos quando expostas *in vitro* às linhagens correspondentes (DOMINICI et al., 2006).

Outros estudos revelaram que marcadores adicionais de maior especificidade, como STRO-1, CD271, CD73 (ecto-5'-nucleotidase, SH3 e SH4) e CD105 (endoglina, SH2), vêm sendo utilizados no intuito de se estabelecer uma caracterização e seleção mais precisas para estas células (SABATINI et al., 2005).

Todavia, é fundamental considerar que as diferenças fenotípicas existentes nas CTm podem refletir diferentes propriedades funcionais, sendo que essa heterogeneidade pode advir de seu microambiente genuíno (KARP et al., 2009).

3.5.1 Propriedade Imunomodulatória

A ação imunomodulatória das CTm foi constatada frente a diversos tipos celulares imunocompetentes como neutrófilos, células dendríticas, linfócitos B e T e células NK. Estudos *in vitro* e *in vivo*, comprovam a ação inibitória por parte das CTm sobre o perfil da resposta imune dos Linfócitos T que, de pró-inflamatória passa a ser anti-inflamatória com a diminuição na concentração de INF- δ e aumento da produção de IL-4 (NAUTA et al., 2006).

Células dendríticas também apresentam diminuição na expressão de proteínas de superfície como o complexo MHC II, CD11c e CD83, além da diminuição na secreção de IL-12 quando na presença de CTm (BARTHOLOMEW et al., 2002).

3.5.2 Capacidade de Migração “Homing”

Homing é definido como a captura das células tronco mesenquimais pela vasculatura de um tecido, seguido de sua transmigração através do endotélio (KARP et al., 2009).

Portanto, para exercerem suas funções terapêuticas, devem sair da vasculatura e atingir o tecido conjuntivo da região estromal do sítio/órgão lesado (KARP; TEO, 2009). Entretanto, durante o trânsito vascular estas células podem sair da circulação instalando-se temporariamente ou permanentemente em órgãos que não aqueles de interesse, como o pulmão, baço e fígado (KARP; TEO, 2009). Isso significa que dependendo do homing que as células tronco façam, pode haver uma redução significativa no número de células ao sítio lesado.

Estudos recentes que buscam a elucidação dos mecanismos de sinalização que regulam o potencial de migração das CTm para sítios de lesão tecidual, comprovam o envolvimento de citocinas e fatores de crescimento neste processo (HUMPHREIS; BONVENTRE, 2008).

Exemplo disso é a citocina SDF-1 (stromal-derived factor-1) que se liga aos receptores CXCR4 os quais apresentam um aumento significativo de expressão nas membranas das células epiteliais dos túbulos renais após a injúria dos rins (TOGEL et al., 2005). O CXCR4 é expressado por CTm e sua expressão aumenta nos quadros de hipóxia, sendo que o conjunto SDF-1/CXCR4 está diretamente envolvido na regulação do potencial de migração das CTm e a pré-incubação destas células em condições de hipóxia parece aumentar sua inserção nos tecidos lesados (HUNG et al., 2007).

Vem sendo sugerido que outro possível regulador de migração seja um fator de crescimento denominado PDGF (platelet-derived growth factor) que é secretado por células epiteliais basais dos túbulos renais em humanos (BURTON et al., 1999). De fato foi comprovado que CTm em cultivo não só expressam receptores de PDGF como apresentam

comportamento migratório em resposta à presença de PDGF exógeno, sendo que esta resposta migratória é potencializada quando as CTm são pré-incubadas em presença do fator de necrose tumoral (TNF) (LOPES PONTE et al., 2007).

Em modelos de estudo da IRA induzida pelo glicerol, o potencial de migração para os rins também parece ser regulado pela expressão de CD44 pelas CTm. Após o estabelecimento da injúria renal foi constatado o aumento da presença do ácido hialurônico que é o receptor para CD44, sendo que a introdução de CTm CD44 negativas comprovou a redução do potencial de migração das CTm para os rins, bem como, na diminuição da proteção dos rins contra o processo de injúria causado pelo glicerol (HERRERA et al., 2007).

Embora tenha sido reportado que a administração de CTm, promova um processo de incorporação destas células exógenas pelos túbulos renais injuriados, favorecendo o processo de reparação tecidual (HERRERA et al., 2004; MORIGI et al., 2004), crescem as evidências de que os eventos de trans-diferenciação celular sejam raros e provavelmente não tenham a relevância terapêutica sugerida na reparação de lesões renais in vivo (HUMPHREIS et al., 2008). Vem sendo sugerido que os processos de reparação sejam oriundos de células tubulares pré-existentes (HUMPHREIS et al., 2008) e ativação de nichos específicos de CTm nas áreas perivasculares (MEIRELLES et al., 2006). Mesmo paradigmas clássicos como a impossibilidade de reparação de podócitos lesados, tornaram-se incertos com a descoberta de CT no epitélio parietal da cápsula de Bowman nos corpúsculos renais dos néfrons (SAGRINATI et al., 2006).

Estudos em modelos de LRA demonstraram que as CTm chegam ao sítio inflamatório/ isquêmico tanto pela via intra-arterial como pela via intra-venosa (ZONTA et al., 2010), contudo, mesmo que diversos estudos demonstrem que as células tronco mesenquimais são capazes de migrarem e se dirigirem aos órgãos e ou tecidos lesados (ALLERS et al., 2004), esse processo ainda não esteja totalmente esclarecido e a mobilização de células-tronco mesenquimais nativas e do homing das células-tronco mesenquimais exógenas infundidas por diversas vias em resposta a um insulto isquêmico/inflamatório, pode variar. Neste contexto, o desenvolvimento de estratégias para que estas células atinjam os tecidos lesados em tempo e concentração suficiente é fundamental para o seu emprego terapêutico.

3.5.3 Engrefment (CTm)

Com a comprovação das propriedades terapêuticas das CTm constatadas por inúmeros autores em diversas patologias, foi atribuído o conceito de que estas seriam incorporadas pelo organismo tratado, diferenciando-se em células especializadas que se integrariam amplamente aos tecidos lesados favorecendo sua regeneração. Esse fenômeno conhecido como “engrafment”, atribuído à produção de uma variedade de citocinas e fatores de crescimento com atividade parácrina e autócrina, permite que as CTm se concentrem ao redor de processos inflamatórios, isquêmicos e tumorais e a partir deste contato, ativem suas propriedades terapêuticas como ação antiinflamatória, angiogênica, antiapoptótica, além de efeito reparador endógeno (GNECCHI et al., 2008).

Neste contexto a utilização de vias sistêmicas para a infusão de CTm se mostra como interessante alternativa no intuito de se simplificar os procedimentos de terapia celular tornando-os menos invasivos.

3.6 Nichos de CT

O termo “nicho” de célula tronco foi proposto por Schofield (1978) ao observar limitados estoques fisiológicos de células (LI; XIE, 2008).

Os nichos de células tronco exercem um papel fundamental na manutenção do indivíduo durante a vida pré-natal e pós-natal. Nos últimos anos, estudos têm revelado a presença de nichos de células-tronco no tecido renal. Através da capacidade de retenção de marcadores como nucleosídeo bromodeoxiuridina (BrdU) e 3H-Thiamidina por células tronco adultas, nichos celulares foram identificados em mamíferos nos bulbos de folículos capilares (COTSARELIS et al., 1990), no epitélio intestinal (POTTEN et al., 2002) e nas papilas renais onde, após a indução de lesões por isquemia-reperfusão, as células marcadas situadas na região papilar, migraram em direção aos sítios lesados (OLIVER et al., 2004).

Ainda nos rins, foram identificados nichos de CT em regiões peri-tubulares (ABBATE et al., 1999), áreas perivasculares (MEIRELLES et al., 2006), no folheto parietal da cápsula de Bowman e nos corpúsculos renais (SAGRINATI et al., 2006).

3.7 Terapia com CT em modelos de LRA

Diversos modelos de indução da LRA vêm sendo utilizados na investigação do efeito e comportamento das CTm, tanto na reparação morfológica e funcional do órgão, como a plasticidade destas células frente a microambientes diversificados.

Basicamente, os protocolos de indução da injúria dos tecidos renais envolvem a utilização de substâncias em concentrações nefrotóxicas ou procedimentos de indução da isquemia temporária dos rins.

No modelo de LRA tóxica induzida pela gentamicina, Reis et al. (2010) demonstraram que as CTm quando administradas antes do insulto, são capazes de prevenir a nefrotoxicidade e quando administradas após o insulto, são capazes de atenuar parcialmente a ação tóxica deste composto sobre os tecidos renais.

A avaliação da terapia celular empregando-se CTm oriundas da MO, em modelo de LRA induzida pelo aciclovir, sugere potencial efeito de reparação destas células sobre os tecidos injuriados (CHRISTO et al., 2010).

Células tronco mesenquimais obtidas a partir da MO, também foram empregadas em modelos de LRA provocada pela ação tóxica do glicerol, comprovando diminuição da injúria renal (JIN-HI, 2008; BRUNO et al., 2009).

A administração de CTm via endovenosa neste modelo, comprovou resultados significativamente superiores do grupo tratado frente ao grupo controle, indicando aumento da proliferação de células tubulares e melhora da função renal (JIN-HI, 2008).

O modelo de LRA induzida pela isquemia, seguida da reperusão sanguínea dos rins é obtida pela oclusão temporária dos pedículos renais e caracteriza-se pela síndrome inflamatória. O emprego de CTm neste modelo de estudo da LRA, também vem comprovando significativos resultados positivos em relação ao efeito destas células sobre os rins lesados (HERRERA et al., 2007; SEMEDO et al., 2007, 2009).

Semedo et al. (2007) administraram CTm via intravenosa 6 horas após a indução da LRA por este método e registraram uma redução dos níveis séricos de creatinina e uréia nos animais tratados, bem como, aumento significativo na expressão da interleucina-4 (IL-4) de ação anti-inflamatória e diminuição da interleucina 1b (IL-1b) de característica pró-inflamatória em relação ao grupo controle, comprovando o aumento na regeneração dos túbulos renais dos animais tratados.

Posteriormente o mesmo grupo comprovou a efetiva ação imunomodulatória das CTm utilizadas no tratamento da LRA induzida por isquemia, relatando a diminuição na expressão de citocinas de caráter pró-inflamatório IL-1b, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF α) e aumento da expressão de IL-4 e IL-10 de ação anti-inflamatória nos animais tratados com terapia celular, resultados estes, acompanhados pela melhora da função renal com a redução dos níveis plasmáticos de creatinina e maior rapidez no processo de regeneração obtido pela análise imunohistoquímica (SEMEDO et al., 2009)

3.8 Vias de Aplicação

O método de aplicação ideal das CTm depende fundamentalmente do tipo e localização dos tecidos lesados, porém, a utilização de vias sistêmicas para a infusão destas células é de grande interesse no intuito de otimizar os procedimentos de terapia celular, tornando-os menos invasivos e mais seguros (KARP; TEO, 2009)

Entretanto, a via sistêmica pode favorecer a instalação destas células temporariamente ou permanentemente em outros tecidos que não aqueles de interesse terapêutico, podendo exercer uma significativa redução no número de células que venham a atingir o sítio lesado e comprometer a eficiência do procedimento (KARP; TEO, 2009).

De fato, a utilização da via sistêmica venosa, parece favorecer maiores concentrações de CTm nos órgãos que atuam como filtros tais como: pulmões, baço e fígado. O inverso ocorre quando da utilização da via sistêmica arterial, que resulta em maior disponibilidade de células para os sítios de isquemia (BARBASH et al., 2003).

A via intravenosa é, certamente, a menos invasiva, porém as vias intra-arterial e intracardíaca proporcionaram melhores índices de fixação em certos modelos de infarto

agudo do miocárdio, reiterando que a eleição da via de aplicação das CTm depende do tipo de patologia em questão (FREYMAN et al., 2006).

Walczak et al. (2008) refere a ocorrência de oclusões microvasculares após injeção intra-arterial de CTm, porém, estudo realizado por Chen et al. (2004) não comprova tal efeito adverso, apesar da infusão de grandes número de CTm.

Em se tratando de patologias renais, recentemente Zonta et al. (2010) testaram as vias: arterial e endovenosa, no intuito de avaliar o melhor procedimento de aplicação de CTm em ratos, após o transplante renal. Este estudo revelou que a utilização da via intra-arterial permitiu que CTm atingissem o enxerto renal e promovessem efeitos imunomodulatórios, ao passo que a via endovenosa, permitiu que parte das células se instalassem no parênquima pulmonar.

Outras vias de administração de CTm menos freqüentes, também podem ser uma opção, como a via subcapsular renal, utilizada em estudo de modelo de DRC induzida por nefrectomia e que revelou resultados que a indicam como uma promissora via de inoculação, vez que um maior número de células ficaram disponível na lesão (CAVAGLIERI, 2009).

Objetivos

4 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o descongelamento, cultivo e expansão da de células-tronco oriundas da polpa dentária decídua de humanos (linhagem CTIPD-5), a fim de utilizá-las no modelo de Necrose Tubular Aguda sob forma terapêutica, avaliando a função renal e comparando o potencial de migração das CTIPD-5 pelas vias endovenosa e intraperitoneal.

4.1 Objetivos Específicos

Foram realizados os seguintes procedimentos experimentais e metodológicos:

- Descongelamento, expansão e caracterização da linhagem celular (CTIPD-5).
- Reprodução do modelo de Necrose Tubular Aguda induzida pelo glicerol em ratos Wistar.
- Estabelecimento do pico da Necrose Tubular Aguda através da avaliação da concentração sérica de creatinina.
- Análise quantitativa por citometria de fluxo da migração das células (CTIPD-5) infundidas pelas vias: endovenosa ou intraperitoneal, presentes nos rins, fígado, músculo estriado esquelético e pulmões.
- Análise da função renal pela dosagem da creatinina sérica.
- Análise das amostras de tecidos renais por: microscopia confocal e microscopia de luz (imunohistoquímica e HE).

Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia aplicada neste trabalho foi dividida em estudo/análise *in vivo* e estudo/análise *in vitro*.

5.1 Estudo *in vitro*

As CTIPD-5 utilizadas no presente trabalho foram isoladas de polpa dentária de dente decíduo e caracterizadas por Kerkis et al. (2006). Estas células permaneceram congeladas no nitrogênio líquido durante aproximadamente seis anos e, portanto, antes de serem utilizadas no tratamento experimental dos animais, procedeu-se nova caracterização da linhagem celular, para se verificar a preservação de suas características originais.

5.1.1 Caracterização das CT *In Vitro*

Para caracterização, as CIPD-5 foram descongeladas e analisadas por citometria de fluxo através dos marcadores de superfície (SH2, SH4, CD90, CD45, CD146, STRO-1), por imunofluorescência (marcadores Nestin e Vimentina) e induzidas *in vitro* para diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica, a fim de demonstrar a multipotencialidade das células após longo período de criopreservação.

5.1.2 Processo descongelamento das CTIPD-5

As CTIPD-5 armazenadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas em banho maria a 37°C e transferidas para tubos de polipropileno de 15ml com meio de cultivo

suplementado com SFB. Em seguida as células foram centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio de cultivo e alíquotadas em garrafas de cultivo para expansão das células. Essas culturas foram mantidas em estufa em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

As alíquotas dessa suspensão foram plaqueadas em placas de Petri de 6 poços sobre lamínulas de vidro de 20 x 20 mm de diâmetro estéreis.

5.1.3 Caracterização das CTIPD-5 por imunofluorescência

As células aderidas sobre as lamínulas foram lavadas duas vezes em solução de PBS e posteriormente fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 1 hora. A seguir, as células fixadas foram lavadas com solução de TBS (Tampão de lavagem - 0,15M NaCl (Sigma), 20mM Tris-HCl (Sigma), e 0,05% de Tween 20 (Sigma), pH 7,4). A membrana celular foi permeabilizada com solução de 0,1% Triton X-100 (Sigma) em TBS. Após a nova sequência de lavagem em TBS, as células foram incubadas em solução de soro de albumina bovina (BSA, Sigma) a 5% em PBS durante 30 minutos para o bloqueio de marcações inespecíficas. Após esse bloqueio, as células foram incubadas com anticorpos primários (Quadro 1) por 1 hora.

Na sequência, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou de cabra conjugado à fluoresceína (FITC) diluído em solução de BSA a 5% em PBS na proporção de 1:500. Essa incubação teve a duração de uma hora em temperatura ambiente e posteriormente, as células foram lavadas na mesma sequência de TBS. Para os controles negativos, os anticorpos primários foram substituídos por PBS.

As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro, utilizando o meio de montagem específico para a imunofluorescência *Vectashield* com DAPI. Foi analisado um mínimo de 100 células por reação para se observar a positividade das reações.

Anticorpo Primário	Tipo	Origem	Diluição	Procedência
Vimentina	Monoclonal	Camundongo	1:250	Santa Cruz
Nestin	Monoclonal	Cabra	1:100	Santa Cruz

Quadro 1 - Anticorpos utilizados na caracterização *in vitro* das CTIPD-5

5.1.4 Caracterização *in vitro* das CTIPD-5 por Citometria de Fluxo

A análise das moléculas de superfície das CTm foi realizada por citometria de fluxo em células pós criopreservação. Os resultados foram plotados em forma de histograma.

As CTm de poupa dentária foram caracterizadas pelos anticorpos: CD146, STRO-1, SH2 e SH4. Para verificar a ausência de CTh, foi utilizado o anticorpo CD45. O anticorpo CD90 foi utilizado sob aspecto negativo, uma vez que é considerado positivo para CTm de MO (Quadro 2).

SH-2	Monoclonal	Camundongo	1:100	Case Western Reserve University
SH-4	Monoclonal	Camundongo	1:100	Case Western Reserve University
CD90			1:100	
STRO-1			1:100	
CD146			1:100	
CD45	Monoclonal	humanos	1:50	Sigma

Quadro 2 - Anticorpos utilizados na caracterização *in vitro* das CTIPD-5 por Citometria de Fluxo

5.1.5 Marcação celular com anticorpos primário e secundário

Seis eppendorfs foram preparados com 100µl de solução tampão (Facs) s/ glicina e Hepes para receberem 1×10^6 CTIPD-5. O anticorpo STRO, precisou de um permeabilizador de membrana Triton X 100 (concentração 0,1%) na dose de 10µl por 30 minutos em temperatura ambiente antes de recebê-lo.

Na etapa seguinte, 1µg de cada anticorpo (SH2, SH4, CD 45, CD 90, STRO-1 e CD146) foram colocados nos respectivos eppendorfs e levados a geladeira por 2 horas.

Em seguida, os eppendorfs receberam 10 µl do anticorpo secundário (Rodamina), com exceção dos eppendorfs que continham os anticorpos CD 45 e o CD 90 naturalmente marcados com FITC e CD146 marcado com PE. Todos foram homogeneizados, fechados, embalados com papel alumínio e colocados em geladeira “overnight”.

Passado 12 horas, os eppendorfs receberam 10 µl de tampão Facs e foram centrifugados a 3000 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pélete ressuspendido em 10 µl de tampão Facs em tubo próprio para citometria de fluxo.

5.1.6 Leitura das CTIPD-5 por Citometria de Fluxo

Um mínimo de 10.000 eventos foi adquirido utilizando o programa CELLQuest. Os resultados foram analisados no programa WinMDI 2.8. A população de células a ser estudada foi definida através de um gráfico de tamanho versus granulosidade em células sem nenhuma marcação. Posteriormente, um gráfico de histograma foi gerado para avaliação da intensidade de fluorescência negativa.

5.1.7 Curva de crescimento das CTIPD-5 pós- criopreservação

A curva de crescimento celular foi realizada por diferentes passagens, no intuito de se avaliar a proliferação das CTIPD-5 após o processo de criopreservação.

Para a realização dessa metodologia, CTIPD-5 em 2ª passagem foi semeada em frascos de 25cm² a uma densidade de 1x10⁵ células em triplicata para cada linhagem. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A tripsinização das células foi realizada periodicamente com intervalos de três dias e o número de células foi contado utilizando câmara de Neubauer. O número de células semeadas inicialmente foi igual a 1x10⁵.

O cálculo utilizado para a contagem das células em cada repique, bem como, o cálculo da divisão das células por garrafa de cultivo T25 estão descritos no quadro 3.

Fórmula para contagem de células por repique	$\frac{\text{Nº total de céls contadas} \times 10^4 \times \text{vol. Suspendido}}{\text{Nº de quadrantes contados}} = \text{total de célula/vol.}$
Fórmula para contagem de células e divisão por garrafa	$\frac{\text{Nº de céls} \times 10^5}{\text{Nº de céls}} = \frac{\text{Vol. do meio ressuspendido}}{X}$

Quadro 3 - Fórmulas para contagem de células

5.1.8 Diferenciação osteogênica

As células tronco isoladas, foram cultivadas em meio de cultura DMEM-LG, com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina, 100 nM dexametasona, 10 mM β-glicerolfosfato e 50 μM ácido ascórbico 2-fosfato. As trocas de meio foram realizadas a cada 3 dias. Após 25 dias de cultivo, as amostras foram avaliadas quanto à atividade de fosfatase alcalina, conforme descrito por Bruder et al.(1995), e caracterizadas pelo método de Von Kossa para determinar a deposição mineral conforme Lennon et al. (1996).

5.1.9 Diferenciação adipogênica

Para diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas em meio DMEM, com 10% soro fetal bovino, 0,25M isobutilmetilxantina, 10 μ M insulina e 1% penicilina. A troca do meio indutor foi realizada a cada 3 dias e mantido por 20 dias. Após este período, as células foram fixadas por 60 minutos a temperatura ambiente com paraformaldéido 4% e lavadas algumas vezes com etanol 70%. Na etapa seguinte foram encubadas a temperatura ambiente por cinco minutos com Oil Red O, o excesso de corante foi retirado com algumas lavagens com água destilada, como descrito por Zuk et al. (2001).

5.1.10 Diferenciação condrogênica

Para diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em meio DMEM, com 1% soro fetal bovino, 6.25 μ M insulina, 10 ng/ml TGF- μ 1 e 1% penicilina. A troca do meio indutor foi realizada a cada 3 dias e mantido por 21 dias. Após este período, as células foram fixadas com paraformaldéido 4% em temperatura ambiente e coradas com Alcian Blue como descrito por Zuk et al. (2001).

5.2 Estudo *in vivo*

O estudo *in vivo* foi realizado após a indução da LRA. A biodistribuição das CTIPD-5 infundidas pelas vias IP e IV, foi analisada pela técnica de citometria de fluxo através dos marcadores de superfície (CD45, CD90, CD146, STRO-1 e anti-CTIPD) nos órgãos: rins, fígado, pulmão e tecido muscular; pela imunohistoquímica dos rins com anticorpos (anti-núcleo humano e anti-CTIPD) e musculatura e pela microscopia confocal renal. A função renal foi avaliada pela dosagem sérica de creatinina.

5.2.1 Modelo Experimental Proposto e Metodologia

Para determinação do momento ideal de aplicação das CTIPD-5 previamente à execução do experimento, foram utilizados 16 ratos Wistar machos com peso entre 200 – 300 g e idade aproximada de 7 - 8 semanas, no intuito de se determinar o pico da NTA através das concentrações séricas de creatinina.

Os valores foram obtidos pela punção venosa do plexo do olho a cada 24 horas após a injeção de Glicerol a 50% (Figura 1). Antes de cada punção, os animais foram sedados com associação de xilazina + cetamina (70mg/Kg). A análise da curva está descrita nos resultados.

Figura 1 - Esquema representativo da metodologia da curva das concentrações séricas de creatinina

Para execução do procedimento experimental, foram utilizados 16 ratos Wistar machos com peso entre 200 – 300 g e idade aproximada de 7 - 8 semanas mantidos em biotério numa sala com controle de temperatura e do ar. Os animais foram obtidos de uma colônia mantida pelo biotério da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

No modelo experimental utilizado, os animais foram divididos de maneira randomizada em quatro grupos (N= 4) sendo: Grupo 1: controle; Grupo 2: Animais induzidos a NTA sem tratamento; Grupo 3: Animais induzidos a NTA e tratados com CTIPD-5 via

Intraperitoneal; Grupo 4: Animais induzidos a NTA e tratados com CTIPD-5 via Endovenosa, conforme a figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática do tempo de execução experimental

No primeiro dia, os animais foram adaptados ao ambiente evitando-se quaisquer manipulações. No dia seguinte, foram submetidos à restrição hídrica/alimentar por 12 horas. Passado esse período, os grupos 2, 3 e 4 foram anestesiados com associação de cetamina + xilazina (70mg/Kg) e receberam 6 mL de glicerol (50%) via intramuscular em ambos membros pélvicos.

Após a injeção de Glicerol, os ratos foram colocados em gaiolas de plástico forradas com maravalha e providos de água e ração *ad libitum*. Vinte e quatro horas após, os animais dos grupos 3 e 4 receberam 7×10^5 CTm de polpa de dente humana linhagem (CTIPD-5) pelas vias intra-peritoneal (IP) e endovenosa (EV) respectivamente (Figura 3). O grupo 1 (controle), não foi manipulado e o grupo 2 foi induzido a NTA mas não recebeu tratamento.

Figura 3 - Aplicação das CTIPD-5 via intraperitoneal (A) e endovenosa (B)

5.2.2 Análise da Creatinina Plasmática

Quarenta e oito horas após a administração das CTIPD-5, aproximadamente 1 mL de sangue foi colhido da aorta abdominal no momento do sacrifício. Para a determinação da creatinina plasmática o sangue foi centrifugado em tubo de ensaio a 5000 RPM por 5 minutos. O soro obtido foi analisado pelo método de Jaffe's. A interpretação estatística dos dados foi realizada no programa Prism 4® (GraphPad Software Inc.)

5.2.3 Rastreamento e análise das CTIPD-5 por Citometria de Fluxo

A análise das moléculas de superfície das CTm foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados expressos em percentagem foram plotados na opção “density plot”. A identificação dos antígenos foi realizada através de diferentes anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos: FITC, ficoeritina (PE, phycoeritin) e Rodamina (RO).

O aparelho foi devidamente calibrado com controle de marcações inespecíficas e os anticorpos utilizados estão listados no quadro 4.

Anticorpo	Especificidade	Fluorocromo Conjugado	Diluição
CD 45	Pan-leucocitário	FITC	1:100
CD 90	CT	FITC	1:100
STRO		Rodamina	1:100
CTIPD	Policlonal anti-CTIPD	Rodamina	1:100
CD146		PE	
VEGF		Rodamina	1:100

Quadro 4 - Anticorpos utilizados no rastreamento das CTIPD-5 nos órgãos: rim, fígado, pulmão e músculo

5.2.4 Preparo da amostra para Citometria de Fluxo

Para a análise por citometria de fluxo, as amostras foram previamente preparadas com um tampão contendo collagenase para o processo de digestão. Digerido, cada material foi filtrado manualmente por uma membrana utilizada em máquinas de hemodiálise (30 mesh), colocado dentro de um tubo de ensaio e centrifugado a 1800 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pélete ressuspendido em 3 mL de tampão de ligação (Ca, glicina, Mg, fator de controle de pH s/ fenol).

5.2.5 Marcação celular com anticorpos primários e secundários

Vinte e sete eppendorfs foram enumerados (9 por grupo) e 100µl de solução tampão (Facs) s/ glicina e Hepes foram colocados em cada um com exceção do primeiro eppendorf que recebeu 200µl para calibrar o fluxômetro.

O eppendorf que recebeu o anticorpo STRO-1 precisou de um permeabilizador de membrana Triton X 100 (concentração 0,1%) na dose de 10µl por 30 minutos em temperatura ambiente antes de recebê-lo.

Na etapa seguinte, 1µg de cada anticorpo (CD 45, CD 90, STRO, CD146, CTIPD e VEGF) foram colocados nos respectivos eppendorfs e levados a geladeira por 2 horas.

Em seguida, os eppendorfs receberam 10 µl do anticorpo secundário (Rodamina), com exceção dos eppendorfs que continham os anticorpos CD 45 e o CD 90 naturalmente marcados com FITC e CD146 marcado com PE. Todos eppendorfs foram homogeneizados, fechados, embalados com papel alumínio e colocados na geladeira “overnight”.

Passado 14 horas, os eppendorfs receberam 10 µl de tampão Facs e foram centrifugados a 3000 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pélete ressuspendido em 10 µl de tampão Facs em tubo próprio para citometria de fluxo.

5.2.6 Leitura no Citômetro de Fluxo FACSCalibur

As análises de expressão foram realizadas em Citômetro de Fluxo FACSCalibur em 10.000 eventos, e as aquisições analisadas pelo programa WinMDI 2.8. A expressão de marcadores foi determinada pela comparação com um isotipo controle marcado com o fluorocromo FITC e PE inespecífico.

No quadro 5 estão listados os anticorpos utilizados na técnica de citometria de fluxo, bem como as suas principais indicações.

CD90 (BD Pharmingen): é expresso em células-tronco hematopoéticas primitivas na medula óssea normal, sangue de cordão umbilical e células do fígado fetal. Thy-1 (CD90) pode ser considerado como um marcador para vários tipos de células estaminais (por exemplo, células-tronco hematopoéticas ou HSCs). Tem sido utilizado como marcador de CTm de MO.

CTIPD : é um marcador de polpa dentária humana.

STRO-1 PE (Santa Cruz): Marcador de superfície expresso em células tronco mesenquimais.

VEGF (Santa Cruz): é um fator de crescimento vascular endotelial. É uma proteína produzida pelas células de sinal que estimula o crescimento de novos vasos sanguíneos.

CD146 (BD Pharmingen): Considerado uma imunoglobulina de cinco domínios Ig. É expresso em embriões de galinha, baço, timo, células T humanas ativadas, células progenitoras endoteliais, como angioblastos e células-tronco mesenquimais, além de ser fortemente expresso em vaso sanguíneo. Tem sido visto como um marcador de células-tronco mesenquimais isoladas de adultos e vários órgãos fetais, sua expressão pode estar ligada a multipotência.

CD45 (BD Pharmingen): é um marcador de CTh. Possui várias isoformas e as células hematopoiéticas expressam uma ou mais dessas isoformas. A expressão especificada das isoformas CD45 pode ser visto nas várias fases de diferenciação das células hematopoéticas normais.

Quadro 5 - Principais indicações dos marcadores utilizados na citometria de fluxo

5.3 Avaliação histológica: Preparo do tecido renal

Ao final dos procedimentos experimentais, os animais foram sacrificados utilizando-se associação anestésica em dose excessiva intraperitoneal de xilazina + cetamina, procedendo-se retirada dos rins e amostra do tecido muscular estriado esquelético a partir da porção vasto lateral do quadríceps femoral (onde foi injetado o Glicerol).

Os fragmentos teciduais foram lavados em tampão fosfato salino e fixados em paraformaldeído a 10% em PBS pH 7,4 a 0,1M.

5.3.1 Técnica Histológica (HE)

Após a fixação, o material foi desidratado em série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em parafina Histosec® (BEHMER, 1976; TOLOSA et al., 2003). As secções histológicas foram obtidas em micrótomo LEICA® (modelo 2165), com espessura média de 5 µm e coradas seguindo as técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE).

5.3.2 Técnica de Imunohistoquímica

O rastreamento das CTIPD-5 injetadas via IP (intraperitoneal) e IV (intravenosa), foi delineado a partir dos anticorpos (anti – CTIPD: marcador de polpa de dente humana e anti – HN: Núcleo humano) de acordo com a quadro 6.

Para a realização da técnica de imunohistoquímica, as lâminas foram desparafinadas em xilol a 50°C durante 30 minutos e em seguida imersas em xilol à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida o material foi hidratado em séries decrescentes de alcoóis (100% e 95%) por 2 minutos e encubado por 10 minutos em solução de hidróxido de amônia para retirada do resíduo de formalina.

Considerando que durante o processo de fixação pode ocorrer o mascaramento de antígenos no tecido, foi utilizada a técnica de recuperação antigênica por calor úmido para aumentar a exposição antigênica, sendo o material imerso em tampão citrato e colocado em banho-maria por 35 minutos.

Na etapa seguinte, a peroxidase endógena das lâminas foi bloqueada com solução de metanol e peróxido de hidrogênio (1:1). Após esta etapa, os tecidos foram encubados com os anticorpos primários em câmara úmida “overnight” a 4°C.

Passado esta fase, o material foi revelado com o kit Envision® (Dako) e desidratado em série crescente de alcoóis (50%, 80%, 95% e 100%).

O cromógeno utilizado foi o DAB® (Dako), as lâminas foram contra-coradas com Hematolixina de Mayer, seladas com permount e visualizadas ao microscópio óptico.

Anticorpo primário	Tipo	Origem	Diluição	Procedência
Núcleo Humano	Monoclonal	Camundongo	1:25	Millipore®
CTIPD	Policlonal		1:1500	Instituto Butantan Lab/ genética

Quadro 6 - Anticorpos utilizados na Técnica de Imunohistoquímica

5.3.1 Técnica para Microscopia Confocal

Para visualização sob microscopia Confocal das CTIPD-5 nos tecidos de interesse, foi utilizado o Kit Vybrant® CFDA SE CELL Tracer® (Invitrogen) para marcação celular. As CTIPD-5 foram tripsinizadas, centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos e ressuspensas em 4 mL de PBS a 37 °C, acrescido de 2µL do corante fluorescente Vybrant®, calculado para um total de 48×10^5 CTIPD-5.

Após este procedimento, as células foram incubadas por 20 minutos a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, sendo posteriormente centrifugadas a 5000 RPM por 5 minutos, ressuspensas em meio de cultivo a 37 °C e deixadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, foram centrifugadas a 5000 RPM por 5 minutos e ressuspensas em 3 mL de PBS a 37 °C, sendo novamente centrifugadas a 5000 RPM por 5 minutos e ressuspensas em 3 mL de solução fisiológica para aplicação. Os grupos IV (intravenoso) e IP (intraperitoneal) receberam 7×10^5 CTIPD-5 (marcadas com Vybrant) em 0,2 mL de solução fisiológica nas suas respectivas vias de aplicação.

5.4 Análises Estatísticas

Para avaliação dos resultados em percentagens de CTIPD-5 presentes nos rins, fígado, pulmão e tecido muscular, obtidos através da citometria de fluxo pelas vias IP e IV, utilizou-se o procedimento PROC MIXED do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.2 (SAS, 1995). Nestas análises adotou-se o seguinte modelo estatístico para cada anticorpo estudado:

$$y_{ijk} = \mu + V_i + O_j + VO_{ij} + e_{ijk}$$

em que,

y_{ijkl} = é a percentagem de células tronco marcadas observado na aplicação i e no órgão de atuação j ;

μ = constante inerente a todas as observações;

V_i = efeito da i -ésima via de aplicação, sendo $i = 1$ (controle), 2 (Glicerol), 3 (Intraperitoneal) e 4 (Intravenosa);

O_j = efeito do j -ésimo órgão de atuação, sendo $j = 1$ (fígado), 2 (músculo), 3 (pulmão) e 4 (rim);

VO_{ij} = efeito da interação dupla da via de aplicação i com o órgão de atuação j ;

e_{ijkl} = efeito aleatório residual associado a percentagem de células tronco marcadas observado na aplicação i e no órgão de atuação j , suposto normalmente e independentemente distribuído com média 0 e variância σ_e^2 .

Para este modelo, uma vez que foram verificados resultados significativos ($P < 0,05$) para Interação dupla dos fatores “via de aplicação” *versus* “órgão de atuação”, procedeu-se os desdobramentos de duas formas: (i) desdobramento de Interação visando avaliar a via de aplicação dentro de cada órgão de atuação; e, (ii) desdobramento de Interação visando avaliar a órgãos de atuação dentro de cada via de aplicação. Em ambos os casos, foi utilizado o Teste t de *Student* como procedimento de comparação múltipla.

Resultados

6 RESULTADOS

***in vitro*: Aspectos Morfológicos das CTIPD-5**

As CTIPD-5 apresentaram morfologia típica para este tipo celular, fusiforme, semelhante aos fibroblastos, com um citoplasma alongado, núcleo grande e extremidades espiculadas (Figura 4A e 4B).

6.1 Curva de crescimento após criopreservação

A curva de crescimento demonstrou que estas células apresentaram uma boa proliferação mesmo após a criopreservação (Figura 4C).

6.2 Caracterização das CTIPD-5 por Citometria de Fluxo

A caracterização por citometria de fluxo demonstrou que as CTIPD-5 mantiveram as suas características após a criopreservação, pois expressaram na mesma intensidade os marcadores de antígeno de superfície: CD45, CD90, CD105(SH-2), CD73(SH-4), STRO-1 e CD146, assim como, nestina e vimentina, testados previamente ao congelamento (Figura 4D - 4K).

6.3 Diferenciação in vitro: Osteogênica, condrogênica e adipogênica

Sob ação de estímulos específicos e condições apropriadas, as CTIPD-5 demonstraram diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica *in vitro* (Figura 5).

Figura 4 – Caracterização das CTIPD-5 após criopreservação

Legenda: (A-K): Caracterização das células CTIPD-5 após longo período de criopreservação.

(A, B): Fotomicrografia das CTIPD-5 (p6), demonstrando em sua morfologia o citoplasma alongado, extremidades espiculadas e núcleo grande. (Objetiva 10X e 20X).

(C): Gráfico da curva de crescimento: 1- antes de longo período de criopreservação; 2 – após descongelamento. Ambas curvas começaram com 1×10^5 células na passagem 6. Somando o número de passagens em quinze, não observamos o declínio das CTIPD-5 na curva de crescimento.

(D-I) Histogramas dos marcadores utilizados na citometria de fluxo. Notar que a análise dos marcadores CD45 (D) e CD90 (E), são negativos, caracterizando a ausência de CTh. Os histogramas dos marcadores SH2/CD105 (F) e SH-4/CD73 (G) expressaram uma forte marcação e o número maior das células positivas, ao passo que os histogramas dos marcadores CD146 (I) e STRO-1 (H) foram positivos, porém com expressividade inferior quando comparados aos SH2 e SH-4. (J-K) Fotomicrografia das CTIPD-5 evidenciando a marcação positiva para proteínas: nestina e vimentina.

Figura 5 - Diferenciação: osteogênica, adipogênica e condrogênica

Legenda: Caracterização da diferenciação osteogênica por Von Kossa (A), adipogênica por Oil Red (B) e condrogênica por Azul Toluidina (C) *in vitro* das células CTIPD, após longo período de criopreservação

7 RESULTADOS

in vivo: Determinação das concentrações plasmáticas de creatinina no modelo de LRA

Os resultados obtidos para determinação do pico da NTA, revelaram que a média mais alta na concentração sérica de creatinina (5,631) ocorreu 24hs após a indução da lesão, indicando diferença altamente significativa em relação ao grupo controle, sendo que as médias das aferições realizadas com 48hs e 72hs (4,327 e 4,282) respectivamente, embora inferiores em relação à análise com 24 hs, indicam diferença significativa frente ao controle (Figura 6).

Contudo, mesmo tendo sido adotado o tempo de 24hs após a lesão para se realizar a aplicação das CTm, a análise estatística entre os grupos 24hs, 48hs e 72hs, indica ausência de diferença significativa, sugerindo que a infusão de CTm poderia ser feita em quaisquer dos 3 momentos avaliados após a indução da lesão com o glicerol.

Figura 6 - Análise das concentrações séricas de creatinina dos animais do grupo controle e após 24, 48 e 72 horas após a indução da lesão renal utilizando-se glicerol.

7.1 Análise Histológica (HE)

A análise histológica dos rins dos animais induzidos a LRA pelo glicerol revelou uma notória dilatação dos túbulos renais corticais em relação ao grupo controle, favorecida pelo achatamento do revestimento epitelial e principalmente a descamação completa do epitélio tubular necrótico, constatando-se vacuolizações citoplasmáticas e acúmulos de restos celulares na luz tubular (Figura 7 D – F)

Os glomérulos se apresentaram morfológicamente normais, assim como, as estruturas em nível medular. Também foram constatados ausência de alterações inflamatórias ou de fibrose intersticial (Figuras 7 e 8).

Em relação aos grupos tratados com CTm, pôde-se perceber em ambos os grupos IP e IV, a presença de congestão vascular caracterizada por hiperemia ativa, decorrente da dilatação arterial que favoreceu o aumento do fluxo sanguíneo nos leitos capilares, características estas particularmente pronunciadas nos vasos sanguíneos presentes na região medular, entre as alças de Henle. Contudo, estas características se apresentaram notadamente mais pronunciadas no grupo IV (Figuras 9 e 10). A análise da região das papilas renais nos dois grupos tratados IP e IV não revelou nada digno de nota (Figura 10 C e F).

Figura 7 - Fotomicrografias da córtex renal de ratos saudáveis do grupo controle (A - C) e submetidos ao efeito do glicerol (D - F), onde são evidenciadas, neste último, características da necrose tubular aguda: dilatação dos túbulos renais corticais apresentando achatamento e/ou descamação do revestimento epitelial (*), presença de debris celulares na luz tubular (+) e células tubulares apresentando características degenerativas (setas). (Coloração HE. Aumentos: A, D - 40X; B, E - 400X; C, F - 600X).

Figura 8 - Fotomicrografias da região medular renal de ratos saudáveis do grupo controle (A - C) e submetidos ao efeito do glicerol (D - F), evidenciando ausência de alterações em nível medular (A, B, D, E) e papilar (C, F). (Coloração HE. Aumentos: A , D, C, F - 40X; B, E - 400X).

Figura 9 - Fotomicrografias da córtex renal de ratos submetidos ao efeito do glicerol e tratados com células mesenquimais via intraperitoneal (A - C) e endovenosa (D - F), evidenciando características da necrose tubular aguda: dilatação dos túbulos renais corticais apresentando achatamento e/ou descamação do revestimento epitelial e presença de debris celulares na luz tubular (*). Notar a congestão de vasos sanguíneos (setas), mais pronunciada no grupo IV (D - F). (Coloração HE. Aumentos: A, D - 40X; B, E, C - 400X; F - 600X).

Figura 10 - Fotomicrografias da região medular renal de ratos submetidos ao efeito do glicerol e tratados com células mesenquimais via intraperitoneal (A - C) e endovenosa (D - F), evidenciando a presença de congestão vascular e aumento do fluxo sanguíneo nos leitos capilares ao lado das alças de Henle, de maneira mais acentuada no grupo IV (D - F). Ausência de alterações morfológicas em nível papilar em ambos os grupos (C, F). (Coloração HE. Aumentos: A, D, C, F - 40X; B, E - 400X).

7.2 Marcação das CTIPD-5 com Vybrant

Para seguir a migração, a suspensão de CTIPD-5 foi marcada *in vitro* com corante Vybrant (vermelho) que é um corante vital composto por nanocristais, o que permite a visualização microscópica, favorecendo claramente a discriminação destas células coradas, dentro do tecido analisado com eventual background (Figura 11).

Figura 11- Enxerte das CTIPD-5 detectado 48 horas após transplante (injeção intravenosa) pela marcação com Vybrant nos tecidos renais (A – C). A) Corte transversal: demonstra células humanas grandes localizadas dentro do túbulo (vermelho). B) Corte sagital: observa-se um grupo das células justapostas dentro do túbulo e células dispersas ao redor dos túbulos. C) Corte transversal: CTIPD-5 apresenta localização intra tubular e enxerte na parede tubular do túbulo proximal (túbulo). A-C. Microscopia Confocal: da direita a esquerda fluorescência (Fm), contraste digital por interferência (CDI), superposição (Fm+CDI). Em (C) contra coloração com hematoxilina. Scale bars: A,B=10µm, C=20µm

Figura 11-(continuação, injeção intravenosa). D) Corte transversal demonstra enxerte de células humana na região perivascular (V) e enxertes múltiplos na região intra tubular (T). Em E e F mesmo que em (D) com aumento maior, observa-se CTIPD-5 localização perivascular (V), nota-se a morfologia semelhante aos pericitos (setas brancas). Em (F) observam-se duas células humanas (nucleos indicados com seta branca) no interior de túbulo (T). Contra coloração com hematoxilina. Microscopia Confocal: da direita a esquerda Fm, CDI e Fm+CDI. Scale bars: D=50µm, E=10µm, F=5 µm.

Figura 12- Enxerte das CTIPD-5 detectado 48 horas após transplante (injeção intraperitoneal) pela marcação com Vybrant nos tecidos renais (A,B). A) Corte transversal demonstra enxerte de células humana na região intra-tubular (T). Em (B) corte sagital observa-se enxertes múltiplas de CTIPD-5 intra-tubular e tubular. C) Controle: tecido com lesão sem aplicação de células. Em (B) contra coloração com hematoxilina. Microscopia Confocal: Fm+CDI. Scale bars: A,B=10µm, C=20µm.

7.3 Marcação as CTIPD-5 por imunohistoquímica

A análise das CTIPD-5 realizada no tecido renal, está descrita nas figuras 15 e 16

Figura 13- Enxerte das CTIPD-5 detectado 48 horas após transplante (injeção intravenosa) pela imunohistoquímica (peroxidase) utilizando anticorpo específico para o núcleo humano (coloração marrom), contra coloração com hematoxilina. A) Corte transversal: demonstra células humanas localizadas entre os túbulos perto de glomérulo. B) Corte transversal: CTIPD-5 enxerte no túbulo. Seta preta indica os nucléolos (Nu) dentro dos nucleos humanos. C e D) Corte sagital: CTIPD-5 apresenta localização intra tubular e enxerte na parede tubular dos túbulos proximais. D1) Controle negativo: animal sem aplicação de células. E) Corte transversal: aumento maior demonstrado os detalhes de marcação. F) Apresenta enxerte de CTIPD-5 na região de aplicação de glicerol, músculo lesado. G) Controle positivo: células de medula óssea humanas. Microscopia de luz. Magnificação, A,C,D,G 20x; B,E,F,G 63x.

Figura 14- Enxerte das CTIPD-5 detectado 48 horas após transplante (injeção intraperitoneal) pela imunohistoquímica (peroxidase) utilizando anticorpo específico para o núcleo humano (coloração marrom), contra coloração com hematoxilina. A) Corte transversal: demonstra células humanas grandes localizadas entre os túbulos perto de glomérulo. B) Corte sagital: observam-se células humanas dentro do túbulo e dispersas ao redor dos túbulos. C e D) Corte sagital com maior aumento: CTIPD-5 apresenta localização intra tubular e enxerte na parede tubular dos túbulos proximais. E) Controle positivo: células de medula óssea humanas. F. Controle negativo: animal não tratado com células submetido a imunomarcção com anticorpo primário e secundário. Microscopia de luz. Magnificação, A,B,F, 20x; C,D,E, 63x.

7.4 Marcação das CTIPD-5 por Citometria de Fluxo

As CTIPD-5 foram rastreadas e analisadas pelos anticorpos (CD45, CD90, CD146, STRO-1 e anti-CTIPD (específico para CTIPD)). A extração das células por gradiente de concentração foi realizada a partir dos órgãos: rim, fígado, pulmão e tecido muscular.

Nos rins, a marcação específica para CTIPD (anti-CTIPD), demonstrou que não há diferença na migração destas células entre as vias IV e IP. No fígado, ainda analisando o mesmo marcador, a via IV obteve uma percentagem maior de CTIPD quando comparada a via IP. Nos pulmões e na musculatura, a quantidade de CTIPD expressas foi significativamente menor quando comparado aos outros órgãos (figura 15). Com exceção dos anticorpos CD45 e CD90, expressos negativamente em todos os grupos e tecidos, os outros marcadores utilizados tiveram o mesmo padrão de comportamento em termos de percentagem quando relacionados os órgãos entre si (figuras 16-18).

Figura 15 - Análise por citometria de fluxo da densidade dos marcadores de superfície de CTm: CD45, CD90, CD146, CTIPD, VEGF e STRO presentes nos pulmões dos animais dos grupos: controle, glicerol, IP e IV.

Fígado

Figura

16- Análise por citometria de fluxo da densidade dos marcadores de superfície de CTm: CD45, CD90, CD146, CTIPD, VEGF e STRO presentes no fígado dos animais representantes dos grupos experimentais.

Figura 17 - Análise por citometria de fluxo da densidade dos marcadores de superfície de CTm: CD45, CD90, CD146, CTIPD, VEGF e STRO presentes nos pulmões dos animais representantes dos grupos experimentais.

Figura 18

- Análise por citometria de fluxo da densidade dos marcadores de superfície de CTm: CD45, CD90, CD146, CTIPD, VEGF e STRO presentes no tecido muscular estriado esquelético dos animais representantes dos grupos experimentais

Os números de observações e as estimativas de médias, desvios padrão, coeficientes de variação, valores de mínimo e máximo para as percentagens de células tronco marcadas, para os diferentes anticorpos avaliados, encontram-se na tabela 1.

Anticorpos	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
CD146	32	6,13	11,56	188,61	0,00	41,40
CD45	32	0,03	0,08	229,05	0,00	0,40
CD90	32	0,04	0,12	265,66	0,00	0,50
CTIPD	32	7,14	11,61	162,69	0,00	41,40
STRO	32	7,03	12,16	173,11	0,00	46,50
VEGF	32	7,75	12,61	162,71	0,00	42,50

Tabela 1 - Números de observações (N), médias (MED), desvios padrão (DP), coeficientes de variação (CV), valores de mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as percentagens de células tronco marcadas, nos diferentes anticorpos avaliados

Via de Aplicação	Fígado ¹	Músculo	Pulmão	Rim
Anticorpo CD146				
Controle ²	0,20 B,a	0,10 A,a	0,70 A,a	0,00 B,a
Glicerol	0,30 B,a	0,05 A,a	0,10 A,a	0,45 B,a
Intraperitoneal	2,95 B,b	0,90 A,b	0,10 A,b	31,80 A,a
Intravenosa	23,20 A,a	3,40 A,b	2,95 A,b	30,90 A,a
Anticorpo CTIPD				
Controle	3,00 BC, a	0,80 A, a	2,50 A, a	0,00 B, a
Glicerol	0,35 C, a	0,00 A, a	0,05 A, a	0,50 B, a
Intraperitoneal	9,10 B, b	1,35 A, b	1,85 A b	33,25 A, a
Intravenosa	19,05 A, b	6,30 A, c	2,00 A, c	34,10 A, a
Anticorpo STRO				
Controle	1,20 C, a	0,10 A, a	0,50 A, a	0,00 C, a
Glicerol	0,20 C, a	0,05 A, a	0,05 A, a	0,65 C, a
Intraperitoneal	9,85 B, b	3,00 A, b,c	0,20 A, c	37,55 A, a
Intravenosa	23,90 A, a	4,85 A, b	0,90 A, b	29,40 B, a
Anticorpo VEGF				
Controle	3,00 B, a	0,40 A, a	0,70 A, a	0,20 B, a
Glicerol	0,30 B, a	0,00 A, a	0,10 A, a	0,60 B, a
Intraperitoneal	4,55 B, b	12,00 A, b	0,40 A, b	36,50 A, a
Intravenosa	21,50 A, b	8,15 A, c	1,85 A, c	33,80 A, a

¹ Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra Maiúscula, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste t de Student; ² Médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste t de Student.

Tabela 2- Estimativas de médias para as percentagens de células tronco marcadas dentro de cada via de aplicação e órgão de atuação observadas nos desdobramentos, para os diferentes anticorpos avaliados.

A tabela 2 pode ser lida em duas dimensões: em linha (de esquerda para a direita) colocamos os órgãos sujeitos a análise; em coluna (de cima para baixo) incluímos os anticorpos e respectivos grupos de animais utilizados. Os grupos de animais incluem: controle (sem lesão e sem células), glicerol (somente lesão), intraperitoneal (lesão + CTIPD via IP), intravenosa (lesão + CTIPD via IV).

Por meio da tabela 2, verifica-se nas colunas que, no fígado, a Via Intravenosa apresentou sempre percentagens de células tronco marcadas significativamente maiores em relação a via Intraperitoneal. Contudo, quando se avalia as percentagens de células tronco marcadas no Rim, observa-se que para os anticorpos CD146, CTIPD e VEGF não foram contempladas diferenças significativas entre as vias Intraperitoneal e intravenosa, as quais exibiram sempre percentagens de células tronco marcadas, superiores ao Controle e Glicerol. Para o anticorpo STRO-1 no rim, a via Intraperitoneal apresentou percentagens de células tronco marcadas significativamente superiores em relação à via de aplicação Intravenosa.

Ainda na tabela 2, verifica-se nas linhas que, para todos os anticorpos avaliados, não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os órgãos de atuação para as vias Controle e Glicerol. Entretanto, para as vias de aplicação Intraperitoneal e Intravenosa, foram observados dois padrões particulares de classificação dos órgãos de atuação, os quais foram dependentes do anticorpo utilizado. Para os anticorpos CD146 e STRO maiores percentagens de células tronco marcadas foram verificadas no fígado e rim, as quais não apresentaram diferenças entre si. Já para os anticorpos CTIPD e VEGF, o rim apresentou percentagens de células tronco marcadas significativamente ($P < 0,01$) superiores em relação ao fígado para ambos os anticorpos.

As análises de variância para os diferentes anticorpos avaliados, considerando o modelo proposto, revelaram efeito significativo ($P < 0,01$) para a fonte de variação relacionada à Interação da via de aplicação (V) com os órgãos de atuação (O). O desdobramento das interações para os diferentes anticorpos avaliados demonstraram padrão similar de resultados. Foram observados efeitos não-significativos ($P > 0,05$) para órgãos músculos e pulmão, enquanto que, efeitos significativos foram verificados para fígado e rim. As estimativas de médias, para as percentagens de células tronco marcadas dentro de cada via de aplicação e órgão de atuação observadas nos desdobramentos para os diferentes anticorpos avaliados, são apresentados na tabela 1.

Figura 20: Percentagens de CTIPD-5 nas diferentes vias de aplicação, dentro de cada órgão de atuação, segundo os anticorpos avaliados: (a) CD146; (b) CTIPD; (c) STRO-1; (d) VEGF.

Discussão

9 DISCUSSÃO

Polpa dentária é uma promissora fonte de células tronco mesenquimais (KERKIS et al., 2006; WEIBO et al., 2006; BRANDON et al., 2008; ERIK et al., 2009). Além de apresentar característica multipotente, pode ser adquirida facilmente, dispensando procedimentos invasivos.

O uso do banco de células tronco para fins terapêuticos têm sido uma realidade vigente tanto na medicina humana como na medicina veterinária. Todavia, muito se questiona quanto a viabilidade destas células após um longo período de criopreservação. O fato é que a viabilidade das células-tronco de origem hematopoiética geralmente é analisada no momento do descongelamento, o que não permite a contagem de células que já entraram em apoptose, mas ainda não morreram. Em se tratando de CTm, a morte celular pode ser avaliada após a sua adesão e nos momentos posteriores através de curva de crescimento.

Adicionalmente, a qualidade das CT pode ser avaliada através de um conjunto de fatores como: expressão de marcadores destas células não diferenciadas e capacidade de diferenciação.

Diferentes trabalhos envolvendo a criopreservação de CTm de polpa dentária, revelaram que este método pode ser empregado seguramente, pois mesmo após um longo período de criopreservação, mantêm-se viáveis (KERKIS et AL., 2006; WEIBO et AL., 2006; BRANDON et AL., 2008; ERIK et AL., 2009).

Sabendo que as CT apresentam potencial terapêutico tanto para DRC como para LRA, no presente trabalho, avaliamos em associação a eficácia das CTIPD-5 após um longo período de criopreservação, considerando como parâmetros de avaliação o eventual efeito renoprotetor das CTIPD-5 pela concentração plasmática de creatinina e o potencial de homing ao órgão alvo pelas técnicas de citometria de fluxo, imunohistoquímica e fluorescência.

O modelo escolhido apresentou alto índice de mortalidade, principalmente quando empregado a técnica estabelecida por (BRESOLIM) que descreve a dose de 10 mL/kg via IM por 3 dias. Todavia, a NTA resultante desta técnica é bem caracterizada histologicamente, o que o torna um bom modelo experimental.

Além do rim, órgão alvo da lesão, analisamos também a presença de CTIPD e expressão das proteínas CD45, CD90, CD146, STRO-1 e VEGF no músculo, fígado e pulmão. Isso se aplica uma vez que o glicerol aplicado via intramuscular gera uma miólise significativa, disponibilizando mais um possível local recrutamento das CTIPD. Fígado e pulmão foram escolhidos, pois após a injeção intravenosa, pode ocorrer nestes órgãos a captação de CTIPD, diminuindo o número de células que chegariam aos rins. Além disso, o estresse oxidativo ocasionado neste modelo experimental, leva ao dano outros órgãos além dos rins, fato este relacionado a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).

O anticorpo CD45 é a proteína que se expressa especificamente em células hematopoiéticas. No presente trabalho utilizamos o CD45 específico humano como um controle negativo para as CTm. Foi demonstrado que as CTIPD não diferenciadas não expressam esta proteína (KERKIS et al., 2006). Por outro lado, sabe-se que CD90 (Try-1) é considerado um marcador de várias células tronco, MSC entre elas, mas principalmente MSC multipotentes derivadas de medula óssea (JIANG et al., 2003). Não observamos a expressão desta proteína pela CTIPD após a sua injeção no modelo experimental proposto. Isso é esperado uma vez que a expressão de CD90 nestas células não foi relatada em nossos estudos anteriores e nem a expressão de CD34 que é um anticorpo comumente utilizado em associação com CD90. Desta forma, podemos sugerir que a CTIPD é uma população que nós isolamos de polpa dentária e que apresenta as características distintas das MSC de medula óssea (JIANG et al. 2003, KERKIS et al., 2006).

Uma vez que a análise de “homing” de CTIPD foi realizada dentro de 24 e 48 horas (tempo não suficiente para as células-tronco se diferenciarem) realizamos a análise dos marcadores de CTM, sendo que demos um enfoque em marcadores diversos: anti-CD146 (marcador de pericitos), anti-STRO-1 (marcador de células-tronco adultas multipotentes) e anti-CTIPD, marcador amplamente utilizado nas nossas diversas pesquisas (KERKIS et al., 2006, 2008, MONTEIRO et al., 2008, FONSECA et al., 2009).

Sabemos que as células-tronco adultas têm fortes efeitos tróficos em resposta à lesões, entre os quais a propriedade angiogênica (CAPLAN, 2007, 2009, 2011). Isso nos fez testar a expressão da proteína VEGF neste trabalho.

Em se tratando de patologias renais, recentemente Zonta e colaboradores (2010) testaram as vias: arterial e endovenosa, no intuito de avaliar o melhor procedimento de

aplicação de CTm em ratos, após o transplante renal. Este estudo revelou que a utilização da via intra-arterial permitiu que CTm atingissem o enxerto renal e promovessem efeitos imunomodulatórios, ao passo que a via endovenosa, permitiu que parte das células se instalassem no parênquima pulmonar.

Isso indica que para obtenção do efeito terapêutico, as CTm devem ser entregues diretamente ao sítio de ativação, pois sua capacidade de recirculação é extremamente enfraquecida pela microcirculação do parênquima (ZONTA et al., 2010).

Conclusão

10 CONCLUSÕES

1. A criopreservação não interfere na viabilidade das CTIP, podendo ser utilizada para armazenar as células por longo período.
2. A análise quantitativa comparativa de CTIPD nos rins administradas nas vias IV ou IP não apresentam diferenças significativas quanto ao potencial de migração.

Referências

11 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, S.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. **Molecular biology of the cell**. 3^a. ed. New York: Garland; 1994. Chap. 19.

AGGARWAL, S.; PITTENGERMF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, p. 1815–1822, 2005.

ALLERS, C.; SIERRALTA, W. D.; NEUBAUER, S.; RIVERA, F.; MINGUELL, J. J.; CONGET, P. A. Dynamic of distribution of human bone marrowderived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. **Transplantation**, v. 78, n. 4, p. 503-508, 2004.

ANGLINI, F.; FORINO, M.; DEL PRETE, D.; TOSETTO, E.; TORREGROSSA, R.; D'ANGELO, A. In search of adult renal stem cells. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 8, p. 474-487, 2004.

BARBASH, I. M.; CHOURAQUI, P.; BARON, J.; FEINBERG, M. S.; ETZION, S.; TESSONE, A. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. **Circulation**, v. 108, n. 7, p. 863-868, 2003.

BARTHOLOMEW, A.; STURGEON, C.; SIATSKAS, M.; FERRER, K.; MCINTOSH, K.; PATIL, S. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Exp. Hematol.**, v. 30, n. 1, p. 42-48, 2002.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual saunders clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2003.

BREZIS, M.; ROSEN, S.; EPSTEIN, F. H. Acute renal failure. In: BRENNER, B. M.; RECTOR, F. C. **The kidney**. 4th ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1991. p. 993-1112.

BRINSTER, R. L.; ZIMMERMANN, J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 11298–11302, 1994.

BRUNO, S.; GRANGE, C.; DEREGBUS, M. C.; CALOGERO, R. A.; SAVIOZZI, S.; COLLINO, F.; MORANDO, L.; BUSCA, A.; FALDA, M.; BUSSOLATI, B.; TETTA, C.; CAMUSSI, G. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 20, p. 1053–1067, 2009.

CAO, B.; ZHENG, B.; JANKOWSKI, R. J. Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. **Nat. Cell Biol.**, v. 5, n. 7, p. 640-646, 2003.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **J. Orthopaedic. Research**, v. 9, p. 641–650, 1991.

CAPLAN, A. I. Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. **Tissue Eng.**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2000.

CAPLAN, A.I. Revulsion is simply not enough: the impending culture war over advances in genetics. **APA News Philo Med.**, v. 2, n. 2, p. 206-209, 2003.

CHRISTO, J. S.; REIS, L. A.; LOPES, P. M.; SCHOR, N. Efeito do potencial de reparação das células tronco mesenquimais (CTMs) na Insuficiência Renal Aguda (IRA) induzida pelo aciclovir em ratas. In: SIMPÓSIO DE CÉLULA TRONCO E TERAPIA CELULAR E GÊNICA DA UNIFESP, 4., . 2010. Falta local de realização do evento.– p. 22.

CLARKE, M. F.; BECKER, M. W. Câncer: o lado maligno das células-tronco. **Scientific American Brasil**, v. 51, n. 8, p. 39-46, 2006.

CONSTANTINESCU, S. Stemness, fusion and renewal of hematopoietic and embryonic stem cells. **J. Cell Mol. Med.**, v. 7, n. 2, p. 103-112, 2003.

COSTA, J. A. C.; VIEIRA-NETO, M. O.; NETO, M. M. Insuficiência Renal Aguda. **Simpósio: Urgências e Emergências Nefrológicas**, v. 36, p. 307-324, 2003.

COTSARELIS, G.; SUN, T. T.; LAVKER, R. M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. **Cell**, v. 61, p. 1329–1337, 1990.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J. Cell Sci.**, v. 119, p. 2204–2213, 2006.

DEXTER, T. M.; MOORE, M. A.; SHERIDAN, A. P. Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras in vitro. **J. Exp. Med.**, v. 145, p. 1612–1616, 1977.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DON, B. R.; RODRIGUEZ, R. A.; HUMPHREYS, M. H. Acute renal failure associated with pigmenturia or crystal deposits. In: SCHRIER, R. W.; GOTTSCHALK, C. W. **Diseases of the kidney**. 6th ed. Boston: Little Brown, 1996. p. 1273-302.

ERICKSON, H. P. Gene knockouts of c-src, transforming growth factor $\alpha 1$, and tenascin suggest superfluous nonfunctional expression proteins. **J. Cell Biol.**, v. 120, n. 5, p. 1079-1081, 1993.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 2156 p.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 9, n. 292, p. 154-156, 1981.

FORRESTER, S. D. Nefropatias e Ureteropatias. In BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual saunders clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2003.

FOTINO, S.; SPORN, P. Non-oliguric acute renal failure after captopril therapy. **Arch. Intern. Med.**, v. 143, p. 1252-1257, 1983.

FRESHNEY, R. I. Biology of the cultured cell. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. 4. ed. New York: Willey. 2000.

FREYMAN, T.; POLIN, G.; OSMAN, H.; CRARY, J.; LU, M.; CHENG, L. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. **Eur. Heart. J.**, v. 27, n. 9, p. 1114-1122, 2006.

GNECCHI, M.; ZHANG, Z.; NI, A.; DZAU, V. J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circ. Res.**, v. 103, n. 11, p. 1204-1219, 2008.

GRAUER, G. F.; LANE, I. F. Insuficiência renal aguda. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, p. 2374-2393.

HERRERA, M. B.; BUSSOLATI, B.; BRUNO, S. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. **Kidney Int.**, v. 72, n. 4, p. 430-441, 2007.

HERRERA, M. B.; BUSSOLATI, B.; BRUNO, S. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. **Int. J. Mol. Med.**, v. 14, p. 1035–1041, 2004.

HUMPHREYS, B. D.; BONVENTRE, J. V. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. **Annu. Rev. Med.**, v. 59, p. 311–315, 2008.

HUMPHREYS, B. D.; VALERIUS, M. T.; KOBAYASHI, A. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. **Cell Stem Cell**, v. 2, p. 284–291, 2008.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B. N.; REINHARDT, R. L.; SCHWARTZ, R. E.; KEENE, C. D.; ORTIZ-GONZALEZ, X. R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW, W. C.; LARGAESPADA, D. A.; VERFAILLIE, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 1-9, 2002.

JUN-HUI SUNA, B.; GAO-JUN T.; ZHANG-LONG, M.; SHENG-HONG, J. In vivo monitoring of magnetically labeled mesenchymal stem cells administered intravascularly in rat acute renal failure. **Swiss Med. Wkly.**, v. 138, n. 27/28, p. 404–412, 2008.

KARP, J. M.; TEO, G. S. L. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. **Cell Stem Cell**, v. 4, p. 206- 216, 2009.

KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; GOMES MASSIRONI, S. M.; PEREIRA, L. V. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, n. 3-4, p. 105-116, 2006.

KERKIS, I.; AMBROSIO, C. E.; KERKIS, A.; MARTINS, D. S.; ZUCCONI, E.; FONSECA, S. A.; CABRAL R. M.; MARANDUBA, C. M.; GAIAD, T. P.; MORINI A. C.; VIEIRA N. M.; BROLIO, M. P.; SANT'ANNA, O. A.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **J. Transl. Med.**, v. 3, n. 6, p. 35, 2008.

- KRAMPERA, M.; GLENNIE, S.; DYSON, J. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, v. 101, p. 3722–3729, 2003.
- KRUSE, E.; KAJAHAN, J.; PETSCHNIK, A. E.; MAASS, A.; KLINK, E.; RAPOPORT, D. H. Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratomas-like structures. **Annals Anatomical**, v. 188, p. 503-517, 2006.
- KUCIA, M.; RECA, R.; CAMPBELL, F. R. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4+SSEA-1+Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. **Leukemia**, v. 20, p. 857–869, 2006.
- LAKSHMIPATHY, U.; VERFAILLIE, C. Stem Cell Plasticity. **Blood Rev.**, v. 19, n. 1, p. 29-38, 2005.
- MANN, L. M.; LENNON, D. P.; CAPLAN, A. I. Cultured rat pulp cells have the potential to form bone, cartilage, and dentin in vivo; In: DAVIDOVITCH, Z.; NORTON, L. A. (Ed.). **Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation**. Boston: Harvard Society of the Advancement of Orthodontics, 1996. p. 7–10.
- MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 78, n. 12, p. 7634-7638, 1981.
- MARTIN-RENDON, E.; WATT, S. M. Exploitation of stem cell plasticity. **Transfusion Medicine**, v. 13, p. 325-349, 2003.
- MINDELL, J.; CHERTOW, G. M. A practical approach to acute renal failure. **Med. Clin. North Am.**, v. 81, p. 731-748, 1997.
- MOORE, K. A.; EMA, H.; LEMISCHKA, I. R. In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 89, p. 4337–4347, 1997.
- MORIGI, M.; IMBERTI, B.; ZOJA, C. Mesenchymal stem cells are renoprotective, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 15, p. 1794–1804, 2004.
- NAGAYA, N.; KANGAWA, K.; ITOH, T.; IWASE, T.; MURAKAMI, S.; MIYAHARA, Y. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. **Circulation**, v. 112, n. 8, p. 1128-1135, 2005.
- NAMITA GILL, J. R.; NALLY, J. V.; FATICA, R. A. Renal failure secondary to acute tubular necrosis: epidemiology, diagnosis, and management. **Chest**, v. 128, p. 2847-2863, 2005.
- NAUTA, A. J.; WESTERHUIS, G.; KRUISSELBRINK, A. B.; LURVINK, E. G.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W. E. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. **Blood**, v. 108, n. 6, p. 2114-2120, 2006.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Insuficiência renal. In: falta autor do livro. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Elsevier, 2006. p. 487- 493.

ODEH, M. The role of reperfusion-induced in the pathogenesis of the crush syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p. 1417-1422, 1991.

OLIVER, J. A.; MAAROUF, O.; CHEEMA, F. H.; MARTENS, T. P.; AL-AWQATI, Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 795-804, 2004.

PESCE, M.; SCHOLER, H. R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. **Stem Cells**, v. 19, p. 271–278, 2001.

PITTENGER, M. F.; MARSHAK, D. R. Adult mesenchymal stem cells. In: MARSHAK, D. R.; GARDNER, R. L.; GOTTLIEB, D. (Ed.). **Stem cells biology**. London: Cold Spring Harbor, 2001, p. 349-374.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, n. 1, p. 33–45, 2003.

POTTEN, C. S.; OWEN, G.; BOOTH, D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. **J. Cell Sci.**, v. 15, p. 2381–2388, 2002.

QU-PETERSEN, Z.; DEASY, B.; JANKOWSKI, R. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. **J Cell Biol.**, v. 27, n. 5, p. 851-864, 2002.

REIS, L. A.; BORGES, F. T.; SIMÕES, M. J.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; SCHOR, N. Efeito das células tronco mesenquimais (CTM) na nefrotoxicidade induzida pela gentamicina. In: SIMPÓSIO DE CÉLULA TRONCO E TERAPIA CELULAR E GÊNICA DA UNIFESP, 4., 2010. Falta local. p. 24.

REIS, L. A.; BORGES, F. T.; SIMÕES, M. J.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; SCHOR, N. Efeito do meio condicionado das células tronco mesenquimais de ratos Wistar sobre a nefrotoxicidade induzida pela gentamicina. In: SIMPÓSIO DE CÉLULA TRONCO E TERAPIA CELULAR E GÊNICA DA UNIFESP, 4., 2010, falta local. – p. 26.

REYES, M.; VERFAILLIE, C. M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 938, p. 231-235, 2001.

RICARDO, S. D.; DEANE, J. A. Adult Stem Cells in Renal injury and repair. **Nephrology**, v. 10, p. 276-282, 2005.

RIOS, M.; WILLIAMS, D. A. Systematic analysis of the ability of stromal cell lines derived from different murine adult tissues to support maintenance of hematopoietic stem cells in vitro. **J. Cell Physiol.**, v. 145, p. 434–443, 1990.

ROECKLEIN, B. A.; TOROK-STORB, B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papiloma virus E6/E7 genes. **Blood**, v. 85, p. 997–1005, 1995.

SABATINI, F.; PETECCHIA, L.; TAVIAN, M.; JODON DE VILLEROCHÉ, V.; ROSSI, G. A.; BROUTY-BOYE, D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Lab. Invest.**, v. 85, n. 8, p. 962-971, 2005.

SAGRINATI, C.; NETTI, G. S.; MAZZINGHI, B. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 7, p. 2443-2456, 2006.

SANZ-RODRIGUEZ, F.; ESTEO, M. G.; BOTELLA, L. M.; BANVILLE, D. Endoglin Regulates Cytoskeletal Organization through Binding to ZRP-1, a Member of the Lim Family of Protein. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 31, p. 32858-32868, 2004.

SAS. **User's guide**: basic and statistic. Cary: SAS, 1995. 1686 p.

SEMEDO, P.; WANG, P. M.; ANDREUCCI, T. H.; CENEDEZE, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A.; REIS, M. A.; PACHECO-SILVA, A.; CÂMARA, N. O. S. Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Tissue Damages Triggered by Renal Ischemia and Reperfusion Injury. **Transplantation Proceedings**, v. 39, p. 421-423, 2007.

SCHENA, F. P.; ABBATTISTA, M. R. Stem Cells: Reparative Medicine and Nephrology. **J. Nephrol.**, v. 16, p. 1-5, 2003.

SHAN, J. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. **Am. J. Cardiol.**, v. 94, n. 1, p. 92-95, 2004.

SIMMONS, P. J.; GRONTHOS, S.; ZANNETTINO, A. C. The development of stromal cells. In LI ZON. (Ed.). **Hematopoiesis**: a developmental approach. New York: Oxford Univ. Press, 2001. p. 718-726.

SIQUEIRA, D. A.; FONSECA, S. A.; ABDELMASSIH, S.; DE MELLO CINTRA LAVAGNOLLI, T.; SERAFIM, R. C.; CLEMENTE SANTOS, E. J.; MOTA MENDES, C.; DE SOUZA PEREIRA, V.; AMBROSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; VISINTIN, J. A.; ABDELMASSIH, R.; KERKIS, A.; KERKIS, I. Human immature dental pulp stem cells contribution to developing mouse embryos: production of human/mouse preterm chimaeras. **Cell Prolif.**, v. 42, n. 2, p. 132-140, 2009.

SITNICKA, E.; RUSCETTI, F. W.; PRIESTLEY, G. V.; WOLF, N. S.; BARTELMEZ, S. H. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 88, p. 82-88, 1996.

THADANI, R.; PASCUAL, M.; BONVENTRE, J. V. Acute renal failure. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 1448-1453, 1996.

THOMPSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiat. Res.**, v. 1, p. 213, 1961.

TOGEL, F.; ISAAC, J.; HU, Z. Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. **Kidney Int.**, v. 67, n. 5, p. 1772-1784, 2005.

TOMA, J. G.; AKHAVAN, M.; FERNANDES, K. J.. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, n. 9, p. 778-784, 2001.

VERFAILLIE, C. M.; GUPTA, P.; PROSPER, F.; HURLEY, R.; LUNDELL, B.; BHATIA, R. The hematopoietic microenvironment: stromal extracellular matrix components as growth regulators for human hematopoietic progenitors. **Hematology**, v. 4, p. 321–333, 1999.

WALCZAK, P.; ZHANG, J.; GILAD, A. A.; KEDZIOREK, D. A.; RUIZ-CABELLO, J.; YOUNG, R. G.; CHEN, S. L.; FANG, W. W.; YE, F.; LIU, Y. H. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. **Stroke**, v. 39, n. 5, p. 54-60, 2005.

WINGFIELD, W. E. **Segredos em medicina veterinária de emergência**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 497 p.

YOON, Y. S.; WECKER, A.; HEYD, L.; PARK, J. S.; TKEBUCHAVA, T.; KUSANO, K. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 2, p. 326-338, 2005.

YOUNG, H. E.; BLACK, A. C. Adult Stem Cells. **Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.**, v. 276, p. 75-102, 2004.

ZAGER, R. A.; BURKHART, K. M.; CONRAD, D. S.; GMUR, D. J. Iron, heme oxygenase, and glutathione: effects on myohemoglobinuric proximal tubular injury. **Kidney Int.**, v. 48, p. 624–634, 1995.

ZONTA, S.; DE MARTINO, M.; BEDINO, G.; PIOTTI, T.; RAMPINO, M.; GREGORINI, F.; FRASSONI, A.; DAL CANTON, P.; DIONIGI, M.; ALESSIANI, M. Which is the most suitable and effective route of administration for mesenchymal stem cell-based immunomodulation therapy in experimental kidney transplantation: endovenous or arterial? **Transplantation Proceedings**, v. 42, p. 1336–1340, 2010.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-4295, 2002.