RITA DE CÁSSIA CAVAGLIERI

**Terapia com células tronco
derivadas do líquido amniótico humano na
nefropatia crônica experimental:
é possível bloquear a progressão da doença renal estabelecida?**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de: Nefrologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Irene de Lourdes Noronha

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cavaglieri, Rita de Cássia

Terapia com células tronco derivadas do líquido
amniótico humano na nefropatia crônica experimental :
é possível bloquear a progressão da doença renal
estabelecida? / Rita de Cássia Cavaglieri. -- São
Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Irene de Lourdes Noronha.

Descritores: 1.Células-tronco mesenquimal
2.Líquido amniótico 3.Nefropatias 4.Nefrectomia
5.Glomerulos renais 6.Citocinas

USP/FM/DBD-486/17

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular – Laboratório de Investigação Médica 29, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), auxílios nº 166266/2013-2 e nº 167276/2017-4 (bolsa de doutorado).

DEDICATÓRIA

Ao meu Deus todo poderoso, o criador do céu e da terra, por me sustentar a trilhar neste caminho muitas vezes árduo. Foi Ele quem me carregou em seus braços nos momentos mais difíceis me dando força e muito abrigo. Em forma de gratidão, devolvo este trabalho como a prova do meu amor e fidelidade aos seus propósitos para minha vida. Agradeço também por ter colocado em meu caminho pais, esposo, e amigos tão maravilhosos. Obrigada por me sustentar até o presente momento. O Senhor é digno de toda Honra, Glória e Poder.

**Porque Deus no-las revelou pelo seu Espírito;
pois o Espírito esquadrinha todas as coisas,
mesmo as profundezas de Deus.**

1 Corintios 2:10

AGRADECIMENTO

Ao meu esposo Rodrigo Peres Medeiros, pois são 4 anos de doutorado e 4 anos que você entrou em minha vida. Obrigada por ser meu equilíbrio, por ser tão carinhoso, companheiro, amigo e conselheiro. Obrigada pela paciência nos últimos dias. Não foi fácil, mas vencemos! Você é a minha benção, meu lindo. Amo você. Aproveito para agradecer aos meus sogros e cunhada pelo amor e carinho.

Aos meus Tios-Pais, Gildinha e Itamar, por me acolherem e me proporcionarem muito amor e carinho. Agradeço a Deus constantemente, por ter escolhido vocês como meus pais, pois ele sabia o quanto vocês zelariam pelo meu crescimento pessoal, profissional, mas principalmente pelo espiritual. Amo vocês.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Irene Noronha, exemplo de seriedade e dedicação à pesquisa e também na área clínica. Admiro seu estímulo permanente ao aprimoramento dos que a cercam. Sou grata por me permitir fazer parte do seu grupo e por me conceder um projeto tão maravilhoso como este. Levarei comigo seus conselhos e farei o possível para aplicá-los no decorrer da minha jornada profissional. Muito obrigada!

À minha amiga Cleonice, pessoa extremamente atenciosa e amorosa. Obrigada por me ajudar a transformar este sonho em realidade. Adoro a sua companhia e seus conselhos. Não importa o quão distante a vida nos coloque, saiba que você estará sempre no meu coração. Sou extremamente grata a você. Simplesmente te adoro!!!

À amiga/filha Thalita, uma menina especial, pura e de coração extremamente bom. Muito obrigada Thata por não medir esforços para me ajudar. Obrigada pelos

conselhos, ensinamentos e também pelas incontáveis risadas. Creio que a recíproca seja verdadeira.

Aos amigos do LIM29 Marcinha, Priscila, Rafael, Justine, Margoth, Andresa, Felipe, Camilla, José e Marcos e também aos nossos digníssimos doutores Elerson e Samirah, agradeço imensamente pelo apoio, respeito, confiança, carinho e amizade, e principalmente por compartilharem sempre comigo meus momentos de D.J., risadas e estresses. Adoro vocês!

Aos alunos atuais de iniciação científica: Justine, Lucas, Luisa Albuquerque, Gisele e Natalia. Muito obrigada por tudo. Por sempre se disporem a me auxiliarem nas mínimas coisas que fizeram grandes diferenças.

Ao Dr. Joel Heimann, pelo agradável convívio e também pelos maravilhosos conselhos. O senhor é uma pessoa que admiro e respeito muito. Tenho orgulho de tê-lo próximo, pois sei que o senhor sempre está pronto para nos dar atenção e ajudar.

À Dr^a Vanda Jorgetti, por ser essa pessoa tão maravilhosa. Também agradeço a Luciene, Ivone e Wagner, por me aguentarem há 15 anos. Por serem amigos verdadeiros para qualquer momento. Amo muito vocês.

Ao meu chefe Prof. Dr. Sergio Bydlowski. Muito obrigada por me acolher e ajudar sempre que precisei. Muito obrigada, mais uma vez, pela sua total compreensão em relação a minha dedicação para a conclusão deste trabalho. Obrigada por sempre me apoiar e também por confiar em mim. Agradeço também a Luciana, Adriana, Rosangela, Nair, Cleide, Denise, Bruno, Mariana, Gisele, Daniela, Jessica, Beatriz, Tatiana, Debora, Linah e Joel. Muito obrigada por tudo.

Ao Dr. Marco Antonio, pela amizade e carinho. Aprendi muito com o senhor nesses últimos anos.

Agradeço a empresa Inopat, em especial a Cristina, por me auxiliar com os experimentos de hibridização *in situ*.

A todos da minha família, pelo apoio, amor e felicidade que me proporcionam. Família é o berço de tudo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro como aluna de pós graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. CÉLULAS TRONCO (CT)	3
I.1.1. Definição de CT	3
I.1.2. Classificação das CT quanto à capacidade de diferenciação	3
I.1.3. Classificação das CT quanto a sua origem	4
<i>I.1.3.a) Células tronco embrionárias (CTe)</i>	4
<i>I.1.3.b) Células tronco adultas</i>	4
I.2. CT MESENQUIMAIS (CTM)	5
I.3. LÍQUIDO AMNIÓTICO – FONTE DE CTM	6
I.3.1. Líquido amniótico (LA)	6
I.3.2. CTm derivadas do líquido amniótico (CTmLA)	9
I.3.3. Papel imunomodulador das CTmLA	10
I.4. TERAPIA COM CT NA DOENÇA RENAL	12
I.4.1. Efeitos da administração de CT em modelos experimentais de IRA	12
I.4.2. Efeitos da administração de CT em modelos experimentais de nefropatia crônica	13
I.4.3. Efeitos da administração de CTmLA na doença renal	15
II. RACIONAL.....	17
III. OBJETIVO	20
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	21
IV.1. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO (Amniocentese)	21
IV.2. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS CTmLA	23
IV.2.1. Cultivo e expansão das CTmLA	23
IV.2.2. Método de tripsinização celular	24
IV.2.3. Caracterização das CTmLA por citometria de fluxo	25
IV.2.4. Diferenciação das CTmLA <i>in vitro</i>	26
<i>IV.2.4.a) Diferenciação osteogênica</i>	27
<i>IV.2.4.b) Diferenciação adipogênica</i>	27
<i>IV.2.4.c) Diferenciação condrogênica</i>	28
IV.3. MODELO EXPERIMENTAL DE DRC: MODELO DE NEFRECTOMIA 5/6	29
IV.4. INOCULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CTMLA NO TECIDO RENAL	30
IV.4.1. Inoculação das ctmla na região subcapsular renal	30
IV.4.2. Hibridização <i>in situ</i> “FISH”	31

IV.5. PROTOCOLOS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	32
IV.6. DESENHO DO ESTUDO	34
IV.7. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE TECIDO	35
IV.8. PRESSÃO ARTERIAL	35
IV.9. EXCREÇÃO URINÁRIA DE PROTEÍNA	36
IV.10. CREATININA SÉRICA	36
IV.11. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	37
IV.11.1. Processo de parafinização, corte e desparafinização do tecido renal	37
IV.11.2. Coloração de Ácido Periódico de Schiff para análise GS	38
IV.11.3. Coloração de Tricômio de Masson para análise de FI.....	38
IV.11.4. Análise histológica para GS e FI.....	39
IV.12. IMUNOHISTOQUÍMICA	39
IV.12.1. Exposição de epítomos	40
IV.12.2. Identificação de macrófagos, leucócitos e miofibroblastos	41
IV.12.3. Identificação de marcadores de podócitos.....	42
IV.12.4. Análise das imunohistoquímicas.....	42
IV.12.4.a) <i>Quantificação de macrófagos e leucócitos</i>	43
IV.12.4.b) <i>Quantificação de miofibroblastos</i>	43
IV.12.4.c) <i>Quantificação de WT-1 e sinaptopodina</i>	43
IV.13. ANÁLISE DE CITOCINAS NO TECIDO	43
IV.13.1. Extração de proteína do tecido renal	44
IV.13.2. Reação MULTIPLEX	44
IV.14. ANÁLISE GÊNICA TECIDUAL	45
IV.14.1. Extração de RNA total	45
IV.14.2. Transcrição Reversa	46
IV.14.3. RT-PCR Tempo Real	46
IV.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
V. RESULTADOS	50
V.1. ISOLAMENTO DE CTmLA DE AMOSTRAS DE AMNIOCENTESE	50
V.2. DIFERENCIAÇÃO CELULAR DAS CTmLA	52
V.2.1. Linhagem osteogênica	52
V.2.2. Linhagem adipogênica	53
V.2.3. Linhagem condrogênica	54
V.3. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL POPULACIONAL DAS CTmLA POR CITOMETRIA DE FLUXO	55
V.4. ESTABELECIMENTO DO MODELO DE DRC	56
V.5. EFEITO DE 1 OU 2 DOSES DE CTmLA EM DRC ESTABELECIDO	56
V.5.1. Localização das células inoculadas no tecido renal	58
V.5.2. Pressão arterial caudal	59
V.5.3. Proteinúria	60
V.5.4. Creatinina sérica	61
V.5.5. Glomeruloesclerose	62
V.5.6. Marcador podocitário WT-1	64
V.5.7. Marcador podocitário sinaptopodina	66
V.5.8. Fibrose intersticial	68
V.5.9. Colágeno tipo I	69

V.5.10. Fibronectina	70
V.5.11. α -SMA (Miofibroblastos)	72
V.5.12. Macrófagos (CD68 ⁺)	73
V.5.13. Leucócitos (CD43 ⁺)	74
V.5.14. MCP-1 and RANTES	75
V.5.15. Citocinas pró-inflamatórias no tecido renal	77
V.5.16. Citocinas Th1 e Th2 no tecido renal	79
VI. DISCUSSÃO	81
VII. RESUMO DOS RESULTADOS	92
VIII. CONCLUSÕES	93
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	Graus centígrados
Δ	<i>Delta</i>
μ	Micro
cel/mm ²	Células por milímetro quadrado
cm ²	centímetro quadrado
dL	decilitro
g	Gramas
IDR	Imunodifusão radial
kg	Kilograma
L	Litro
m	Molar
mg	miligramas
mm	Milímetro
Hg	Mercúrio
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
mg/kg	Miligramas/ kilograma
mL	Mililitro
M	Molar
nM	nanoMolar
U/ml	Unidades/mililitros
Vol	Volume
α	Alfa
β	Beta
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa
CD	<i>Cluster determinant</i>
CT	Célula-tronco
CTa	Célula-tronco adultas
CTdmo	Célula-tronco derivada de medula óssea
CTe	Célula-tronco embrionária
CTh	Célula-tronco hematopoiética
CTm	Células-tronco mesenquimais
CTmLA	Células-tronco mesenquimais derivadas do Líquido amniótico
dL	Decilitro
DAB	diaminobenzidina
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dubelco
DRC	Doença renal crônica
DT	Dilatação tubular
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FI	Fibrose intersticial
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GS	Glomeruloesclerose
HRP	<i>Horseradish peroxidase complex</i>
IL	Interleucina
LA	Líquido amniótico

MO	Medula óssea
NTA	Necrose tubular aguda
Nx	Nefrectomia 5/6
PAS	Ácido periódico de Shiff
PBS	Phosphate Buffer Solution
PE	Ficoeritrina
PE-Cy5.5	Ficoeritrina Cy5.5
pH	Potencial hidrogênico
RCF	Força Centrífuga Relativa
RPM	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovina
vs	versus
WT-1	Gene do tumor de Wilms 1

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Trabalhos publicados com <i>time points</i> diferentes de inoculação de CT em modelo de nefrectomia 5/6	19
TABELA 2.	Anticorpos utilizados para caracterização das CTm derivadas de LA, por citometria de fluxo	25
TABELA 3.	Anticorpos utilizados na imunohistoquímica.....	40
TABELA 4.	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para o PCR em tempo real	48
TABELA 5.	Resultados dos parâmetros clínico-laboratoriais e histológicos dos animais que receberam CTmLA após 15 dias da indução da lesão renal e que foram submetidos a eutanásia após 30 dias e 60 dias de experimento.....	57
TABELA 6.	Resultados da imunohistoquímica para identificar podócitos (através da detecção de WT-1 e sinaptopodina), nos diferentes grupos	63
TABELA 7.	Resultados da imunohistoquímica para mifibroblastos (α -SMA), macrófagos (CD68) e leucócitos (CD43) nos diferentes grupos	71
TABELA 8.	Concentração das quimiocinas MCP-1 e RANTES quantificadas por multiplex no tecido renal dos animais 30 dias após cirurgia	75
TABELA 9.	Resultados da expressão gênica (PCR-tempo real) e proteica (multiplex) das citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido renal dos animais após 30 dias de experimento	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Imagem representativa da amniocentese para a obtenção de líquido amniótico	22
FIGURA 2.	Imagem representativa da inoculação de células tronco na região subcapsular renal de ratos	30
FIGURA 3.	Imagem representativa dos desenhos de estudo. A) protocolo experimental I; B) Protocolo experimental II	37
FIGURA 4.	Imagem representativa das células isoladas com formato fibroblastóide (<i>fibroblast-like colonies</i>), crescendo em colônias após coloração com giemsa. A) visão macroscópica das colônias de células; B) Visão microscópica de uma colônia celular (100x); C) Imagem representativa das células com característica fusiforme durante o cultivo celular (400x)	51
FIGURA 5.	Diferenciação das CTmLA em células da linhagem osteogênica. A) Células indiferenciadas não apresentaram nenhuma coloração; B) Coloração vermelha de alizarina para visualização de cálcio; C) Coloração resultante da atividade da fosfatase alcalina, produzida pelas células	52
FIGURA 6.	Caracterização da diferenciação adipogênica das CTm derivadas de LA. A) Células indiferenciadas não apresentaram nenhuma coloração; B e C) Vacúolos lipídicos presentes após a coloração de Oil-Red	53
FIGURA 7.	Caracterização da diferenciação condrogênica. A) Células indiferenciadas não apresentaram nenhuma coloração B) Deposição de matriz extracelular detectada após a Coloração por Alcian Blue	54
FIGURA 8.	Caracterização celular de marcadores de superfície por citometria de fluxo. CTm foram positivas para CD29, CD44, CD90 e CD105 e negativas para CD14, CD31, CD34, CD45, CD86 e CD117	55
FIGURA 9.	Localização da CTmLA no tecido renal. A, B e C) animais Nx 30 dias que receberam CTmLA humanas diretamente no tecido renal	58
FIGURA 10.	Pressão caudal nos diferentes grupos	59
FIGURA 11.	Proteinúria nos animais dos diferentes grupos	60
FIGURA 12.	Albuminúria dos animais dos diferentes grupos	61
FIGURA 13.	Porcentagem de glomeruloesclerose nos diferentes grupos	62
FIGURA 14.	Expressão gênica de WT-1, por PCR em tempo real, nos diferentes grupos	64

FIGURA 15. Expressão de WT-1 nos diferentes grupos	65
FIGURA 16. Expressão gênica da sinaptopodina, por PCR em tempo real, nos diferentes grupos	66
FIGURA 17. Expressão de sinaptopodina nos diferentes grupos experimentais	67
FIGURA 18. Porcentagem de fibrose intersticial nos diferentes grupos	68
FIGURA 19. Expressão gênica de colágeno tipo I, por PCR em tempo real, nos diferentes grupos	79
FIGURA 20. Expressão gênica de fibronectina, por PCR em tempo real, nos diferentes grupos	70
FIGURA 21. Resultados da expressão de α -SMA no tecido renal dos diferentes grupos, refletindo o número de miofibroblastos intersticiais	72
FIGURA 22. Resultados da média do número de macrófagos no interstício renal nos diferentes grupos	73
FIGURA 23. Média do número de leucócitos CD43 ⁺ no interstício renal dos diferentes animais dos diferentes grupos	74
FIGURA 24. Concentração dos marcadores MCP1 e RANTES no tecido renal dos animais dos grupos estudados	75
FIGURA 25. Expressão gênica e concentração proteica de IL-1 β , TNF- α e IL-6 no tecido renal dos animais dos grupos 30 dias	78
FIGURA 26. Expressão gênica e concentração proteica de IL-2, INF- γ , IL-4 e IL-10 no tecido renal dos animais dos grupos 30 dias	80

RESUMO

Cavaglieri RC. Terapia com células tronco derivadas do líquido amniótico humano na nefropatia crônica experimental: é possível bloquear a progressão da doença renal estabelecida? [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Células tronco mesenquimais (CTm) apresentam potencial para tratamento da doença renal pela possibilidade de promover regeneração tecidual e recuperação funcional, possivelmente por seus efeitos parácrinos. Na última década, o líquido amniótico foi descrito como uma fonte promissora de extração e isolamento de CTm. Alguns estudos mostraram o efeito renoprotetor das CTm derivadas do líquido amniótico (CTmLA) na doença renal aguda e crônica, quando inoculadas precocemente. Entretanto, ainda não foi estudado o efeito da administração de CTmLA em modelo experimental de doença renal crônica (DRC) com a lesão já estabelecida, situação esta que reproduz melhor a apresentação clínica da doença nos pacientes. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da inoculação de CTmLA na região subcapsular renal no modelo de DRC já estabelecido. As CTmLA foram obtidas de pacientes no segundo trimestre de gestação e isoladas através da sua capacidade de aderência ao plástico. A caracterização das CTm foi feita por citometria de fluxo e pela diferenciação celular *in vitro*. O modelo de DRC utilizado foi o de nefrectomia 5/6 (Nx) que, pela perda de massa renal, evolui com hipertensão arterial, proteinúria, glomeruloesclerose, fibrose intersticial e perda progressiva da função renal. Quinze dias após a indução do modelo, estas alterações já são marcantes e agravam-se com 30 dias. Foram realizados 2 protocolos experimentais: no protocolo I, os animais Nx com DRC estabelecida receberam dose única de CTmLA (5×10^5) na região subcapsular renal e foram acompanhados por 30 e 60 dias de experimento. No protocolo II, os animais Nx com DRC estabelecida receberam duas doses de CTmLA (5×10^5) na região subcapsular renal, no 15º e 30º dia após a nefrectomia 5/6, e foram acompanhados por 30 dias, totalizando 60 dias de experimento. Os animais foram subdivididos nos grupos: Sham, ratos submetidos à cirurgia fictícia; Sham+CTmLA, ratos submetidos à Sham que receberam CTmLA; Nx, ratos submetidos à nefrectomia 5/6; Nx+CTmLA, ratos Nx que receberam CTmLA. Para verificar a localização das CTmLA no tecido renal foi realizada a hibridização *in situ* para cromossomo XY. Foram realizadas análises dos parâmetros clínicos e laboratoriais, além de análise histológica, imunohistoquímica, PCR em tempo real e multiplex. Resultados: as CTmLA cultivadas mostraram grande capacidade de aderência, crescimento em colônia e de diferenciação em células osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas. A análise por citometria mostrou-se positiva para CD29, CD44, CD90 e CD105, com uma pequena população de células de CD14, CD34, CD45 e CD117, confirmando a presença preponderante de CTm. Protocolo I: Após 30 dias, a inoculação de CTmLA, dose única, preveniu a elevação da pressão arterial, da proteinúria, da glomeruloesclerose, recuperando a expressão dos marcadores de podócitos, WT-1 e sinaptopodina. Entretanto, não houve efeito benéfico nos níveis de creatinina sérica e na fibrose intersticial, após 30 e 60 dias. O tratamento com CTmLA promoveu uma diminuição marcante do número de macrófagos e uma discreta queda dos leucócitos no infiltrado inflamatório renal, além da diminuição do número de miofibroblastos no interstício renal. Citocinas pró-inflamatórias foram encontradas em menor concentração no tecido renal dos animais que receberam CTmLA (IL-1 β , TNF- α ,

MCP-1 e RANTES). Não houve alteração significativa das citocinas Th1 e Th2, exceto por um aumento da IL-4 nos animais tratados com CTmLA. Os animais que foram acompanhados por 60 dias tiveram uma melhora da proteinúria, da glomeruloesclerose, diminuição do infiltrado de macrófagos e uma melhora da expressão de WT-1. Não foram observadas diferenças estatísticas nos parâmetros de creatinina sérica e fibrose intersticial, aos 30 e 60 dias. Protocolo II: Nos animais que receberam a segunda dose de CTmLA e foram acompanhados por 60 dias observou-se prevenção da elevação da pressão arterial e da proteinúria, além de uma marcante diminuição da fibrose intersticial. Em conclusão, o presente estudo mostrou, pela primeira vez, que a terapia com CTmLA foi capaz de induzir renoproteção nos animais com doença renal crônica estabelecida. O tratamento com CTmLA pode representar uma nova abordagem terapêutica bloqueando a progressão da doença renal crônica.

Descritores: células-tronco mesenquimal; líquido amniótico; nefropatias; nefrectomia; glomérulos renais; citocinas

SUMMARY

Cavaglieri RC. Stem cell therapy in experimental chronic nephropathy: is it possible to block the progression of renal disease in the established injury? [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Mesenchymal stem cells (mSC) represent therapeutic potential for the treatment of renal diseases, due to their ability to induce tissue regeneration and functional recovery. Human amniotic fluid stem cells (AFmSC) are a class of fetal, pluripotent stem cells, which present characteristics intermediate between embryonic and adult stem cells. These cells are characterized by the expression of mesenchymal stem cells markers. In addition, they have the ability to differentiate into lineages of all embryonic germ layers. They also show high proliferative rates, but do not induce tumor formation. Therefore, AFmSC are considered to be a very promising cell source and these characteristics have generated a great interest concerning their potential renoprotective effects. The aim of this study was to analyze the effects of AFmSC in an experimental model of chronic kidney disease, the 5/6 nephrectomy model (Nx), after the disease has been established, in order to more closely resemble the clinical settings in humans. AFmSC derived from second-trimester amniocentesis were isolated by plastic adhesion. After 4-7 passages, AFmSC characteristics were confirmed by flow cytometry and by their ability to differentiate into osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages. Two experimental protocols were performed: In protocol I, rats underwent 5/6 nephrectomy (Nx) or sham surgery at day 0, received at day 15 a single dose of hAFmSC (5×10^5 cells) injected under the renal capsule and were studied at day 30 and 60 days. In protocol II, rats underwent Nx or sham surgery, and received at days 15 and 30, two doses of hAFmSC (5×10^5 cells) injected under the renal capsule, and were studied at day 60. In both protocols, the animals were subdivided into four groups: Sham, rats submitted to fictitious surgery; Sham+hAFmSC, Sham rats that received hAFmSC; Nx, rats submitted to nephrectomy 5/6; Nx+hAFmSC, Nx rats receiving hAFmSC. The hAFmSC were followed in the renal tissue by *in situ* hybridization for XY chromosome. In all the groups, clinical and histological parameters were analyzed by immunohistochemistry and real-time PCR. Results: AFmSC cultivated demonstrated an ability to adhere to plastic, to grow in colonies and to differentiate in osteogenic, adipogenic and chondrogenic cells. Quantitative analysis of cell markers by flow cytometry showed that isolated cells were positive for CD29, CD44, CD90 and CD105, with a small population of cells positive for CD14, CD34, CD45 and CD117, confirming a preponderant presence of mSC. Protocol I: After 30 days, the single dose of hAFmSC significantly reduced the blood pressure levels, proteinuria, glomerulosclerosis and improved the expression of podocytes markers, WT-1 and synaptopodin. A marked decrease on the number of macrophages and a discrete decrease of leucocyte infiltration, as well as a reduction of interstitial myofibroblasts was observed. Treatment with hAFmSC significantly reduced some proinflammatory cytokines (IL1 β , TNF- α , MCP-1 and RANTES). No significant difference in Th1 or Th2 cytokines was observed, except for IL-4 increase in Nx rats treated with hAFmSC. At 60 days of follow-up, Nx rats treated with hAFmSC presented reduced proteinuria, glomerulosclerosis and macrophages besides increase in WT-1 expression. No improvements were observed on serum creatinine and of interstitial fibrosis, after 30

and 60 days. Protocol II: Inoculation of two doses of hAFmSC in Nx rats improved blood pressure levels, proteinuria and interstitial fibrosis at day 60. In conclusion, the present study demonstrated, for the first time, that hAFmSC induced renoprotection in animals with established chronic kidney disease. Treatment with hAFmSC may represent a novel therapeutic approach for blocking the progression of chronic kidney disease.

Descriptors: mesenchymal stem cells; amniotic fluid; kidney diseases; nephrectomy; kidney glomerulus; cytokines

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular – Laboratório de Investigação Médica 29, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), auxílios nº 166266/2013-2 e nº 167276/2017-4 (bolsa de doutorado).

DEDICATÓRIA

Ao meu Deus todo poderoso, o criador do céu e da terra, por me sustentar a trilhar neste caminho muitas vezes árduo. Foi Ele quem me carregou em seus braços nos momentos mais difíceis me dando força e muito abrigo. Em forma de gratidão, devolvo este trabalho como a prova do meu amor e fidelidade aos seus propósitos para minha vida. Agradeço também por ter colocado em meu caminho pais, esposo, e amigos tão maravilhosos. Obrigada por me sustentar até o presente momento. O Senhor é digno de toda Honra, Glória e Poder.

**Porque Deus no-las revelou pelo seu Espírito;
pois o Espírito esquadrinha todas as coisas,
mesmo as profundezas de Deus.**

1 Coríntios 2:10

AGRADECIMENTO

Ao meu esposo Rodrigo Peres Medeiros, pois são 4 anos de doutorado e 4 anos que você entrou em minha vida. Obrigada por ser meu equilíbrio, por ser tão carinhoso, companheiro, amigo e conselheiro. Obrigada pela paciência nos últimos dias. Não foi fácil, mas vencemos! Você é a minha benção, meu lindo. Amo você. Aproveito para agradecer aos meus sogros e cunhada pelo amor e carinho.

Aos meus Tios-Pais, Gildinha e Itamar, por me acolherem e me proporcionarem muito amor e carinho. Agradeço a Deus constantemente, por ter escolhido vocês como meus pais, pois ele sabia o quanto vocês zelariam pelo meu crescimento pessoal, profissional, mas principalmente pelo espiritual. Amo vocês.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Irene Noronha, exemplo de seriedade e dedicação à pesquisa e também na área clínica. Admiro seu estímulo permanente ao aprimoramento dos que a cercam. Sou grata por me permitir fazer parte do seu grupo e por me conceder um projeto tão maravilhoso como este. Levarei comigo seus conselhos e farei o possível para aplicá-los no decorrer da minha jornada profissional. Muito obrigada!

À minha amiga Cleonice, pessoa extremamente atenciosa e amorosa. Obrigada por me ajudar a transformar este sonho em realidade. Adoro a sua companhia e seus conselhos. Não importa o quão distante a vida nos coloque, saiba que você estará sempre no meu coração. Sou extremamente grata a você. Simplesmente te adoro!!!

À amiga/filha Thalita, uma menina especial, pura e de coração extremamente bom. Muito obrigada Thata por não medir esforços para me ajudar. Obrigada pelos

conselhos, ensinamentos e também pelas incontáveis risadas. Creio que a recíproca seja verdadeira.

Aos amigos do LIM29 Marcinha, Priscila, Rafael, Justine, Margoth, Andresa, Felipe, Camilla, José e Marcos e também aos nossos digníssimos doutores Elerson e Samirah, agradeço imensamente pelo apoio, respeito, confiança, carinho e amizade, e principalmente por compartilharem sempre comigo meus momentos de D.J., risadas e estresses. Adoro vocês!

Aos alunos atuais de iniciação científica: Justine, Lucas, Luisa Albuquerque, Gisele e Natalia. Muito obrigada por tudo. Por sempre se disporem a me auxiliarem nas mínimas coisas que fizeram grandes diferenças.

Ao Dr. Joel Heimann, pelo agradável convívio e também pelos maravilhosos conselhos. O senhor é uma pessoa que admiro e respeito muito. Tenho orgulho de tê-lo próximo, pois sei que o senhor sempre está pronto para nos dar atenção e ajudar.

À Dr^a Vanda Jorgetti, por ser essa pessoa tão maravilhosa. Também agradeço a Luciene, Ivone e Wagner, por me aguentarem há 15 anos. Por serem amigos verdadeiros para qualquer momento. Amo muito vocês.

Ao meu chefe Prof. Dr. Sergio Bydlowski. Muito obrigada por me acolher e ajudar sempre que precisei. Muito obrigada, mais uma vez, pela sua total compreensão em relação a minha dedicação para a conclusão deste trabalho. Obrigada por sempre me apoiar e também por confiar em mim. Agradeço também a Luciana, Adriana, Rosângela, Nair, Cleide, Denise, Bruno, Mariana, Gisele, Daniela, Jessica, Beatriz, Tatiana, Debora, Linah e Joel. Muito obrigada por tudo.

Ao Dr. Marco Antonio, pela amizade e carinho. Aprendi muito com o senhor nesses últimos anos.

Agradeço a empresa Inopat, em especial a Cristina, por me auxiliar com os experimentos de hibridização *in situ*.

A todos da minha família, pelo apoio, amor e felicidade que me proporcionam. Família é o berço de tudo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro como aluna de pós graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. CÉLULAS TRONCO (CT)	3
I.1.1. Definição de CT	3
I.1.2. Classificação das CT quanto à capacidade de diferenciação	3
I.1.3. Classificação das CT quanto a sua origem	4
<i>I.1.3.a) Células tronco embrionárias (CTe)</i>	4
<i>I.1.3.b) Células tronco adultas</i>	4
I.2. CT MESENQUIMAIS (CTM)	5
I.3. LÍQUIDO AMNIÓTICO – FONTE DE CTM	6
I.3.1. Líquido amniótico (LA)	6
I.3.2. CTm derivadas do líquido amniótico (CTmLA)	9
I.3.3. Papel imunomodulador das CTmLA	10
I.4. TERAPIA COM CT NA DOENÇA RENAL	12
I.4.1. Efeitos da administração de CT em modelos experimentais de IRA	12
I.4.2. Efeitos da administração de CT em modelos experimentais de nefropatia crônica	13
I.4.3. Efeitos da administração de CTmLA na doença renal	15
II. RACIONAL.....	17
III. OBJETIVO	20
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	21
IV.1. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO (Amniocentese)	21
IV.2. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS CTmLA	23
IV.2.1. Cultivo e expansão das CTmLA	23
IV.2.2. Método de tripsinização celular	24
IV.2.3. Caracterização das CTmLA por citometria de fluxo	25
IV.2.4. Diferenciação das CTmLA <i>in vitro</i>	26
<i>IV.2.4.a) Diferenciação osteogênica</i>	27
<i>IV.2.4.b) Diferenciação adipogênica</i>	27
<i>IV.2.4.c) Diferenciação condrogênica</i>	28
IV.3. MODELO EXPERIMENTAL DE DRC: MODELO DE NEFRECTOMIA 5/6	29
IV.4. INOCULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CTMLA NO TECIDO RENAL	30
IV.4.1. Inoculação das ctmla na região subcapsular renal	30
IV.4.2. Hibridização <i>in situ</i> “FISH”	31

IV.5. PROTOCOLOS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	32
IV.6. DESENHO DO ESTUDO	34
IV.7. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE TECIDO	35
IV.8. PRESSÃO ARTERIAL	35
IV.9. EXCREÇÃO URINÁRIA DE PROTEÍNA	36
IV.10. CREATININA SÉRICA	36
IV.11. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	37
IV.11.1. Processo de parafinização, corte e desparafinização do tecido renal	37
IV.11.2. Coloração de Ácido Periódico de Schiff para análise GS	38
IV.11.3. Coloração de Tricômio de Masson para análise de FI.....	38
IV.11.4. Análise histológica para GS e FI.....	39
IV.12. IMUNOHISTOQUÍMICA	39
IV.12.1. Exposição de epítomos	40
IV.12.2. Identificação de macrófagos, leucócitos e miofibroblastos	41
IV.12.3. Identificação de marcadores de podócitos.....	42
IV.12.4. Análise das imunohistoquímicas.....	42
IV.12.4.a) <i>Quantificação de macrófagos e leucócitos</i>	43
IV.12.4.b) <i>Quantificação de miofibroblastos</i>	43
IV.12.4.c) <i>Quantificação de WT-1 e sinaptopodina</i>	43
IV.13. ANÁLISE DE CITOCINAS NO TECIDO	43
IV.13.1. Extração de proteína do tecido renal	44
IV.13.2. Reação MULTIPLEX	44
IV.14. ANÁLISE GÊNICA TECIDUAL	45
IV.14.1. Extração de RNA total	45
IV.14.2. Transcrição Reversa	46
IV.14.3. RT-PCR Tempo Real	46
IV.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
V. RESULTADOS	50
V.1. ISOLAMENTO DE CTmLA DE AMOSTRAS DE AMNIOCENTESE	50
V.2. DIFERENCIAÇÃO CELULAR DAS CTmLA	52
V.2.1. Linhagem osteogênica	52
V.2.2. Linhagem adipogênica	53
V.2.3. Linhagem condrogênica	54
V.3. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL POPULACIONAL DAS CTmLA POR CITOMETRIA DE FLUXO	55
V.4. ESTABELECIMENTO DO MODELO DE DRC	56
V.5. EFEITO DE 1 OU 2 DOSES DE CTmLA EM DRC ESTABELECIDO	56
V.5.1. Localização das células inoculadas no tecido renal	58
V.5.2. Pressão arterial caudal	59
V.5.3. Proteinúria	60
V.5.4. Creatinina sérica	61
V.5.5. Glomeruloesclerose	62
V.5.6. Marcador podocitário WT-1	64
V.5.7. Marcador podocitário sinaptopodina	66
V.5.8. Fibrose intersticial	68
V.5.9. Colágeno tipo I	69

V.5.10. Fibronectina	70
V.5.11. α -SMA (Miofibroblastos)	72
V.5.12. Macrófagos (CD68 ⁺)	73
V.5.13. Leucócitos (CD43 ⁺)	74
V.5.14. MCP-1 and RANTES	75
V.5.15. Citocinas pró-inflamatórias no tecido renal	77
V.5.16. Citocinas Th1 e Th2 no tecido renal	79
VI. DISCUSSÃO	81
VII. RESUMO DOS RESULTADOS	92
VIII. CONCLUSÕES	93
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	Graus centígrados
Δ	<i>Delta</i>
μ	Micro
cel/mm ²	Células por milímetro quadrado
cm ²	centímetro quadrado
dL	decilitro
g	Gramas
IDR	Imunodifusão radial
kg	Kilograma
L	Litro
m	Molar
mg	miligramas
mm	Milímetro
Hg	Mercúrio
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
mg/kg	Miligramas/ kilograma
mL	Mililitro
M	Molar
nM	nanoMolar
U/ml	Unidades/mililitros
Vol	Volume
α	Alfa
β	Beta
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa
CD	<i>Cluster determinant</i>
CT	Célula-tronco
CTa	Célula-tronco adultas
CTdmo	Célula-tronco derivada de medula óssea
CTe	Célula-tronco embrionária
CTh	Célula-tronco hematopoiética
CTm	Células-tronco mesenquimais
CTmLA	Células-tronco mesenquimais derivadas do Líquido amniótico
dL	Decilítro
DAB	diaminobenzidina
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dubelco
DRC	Doença renal crônica
DT	Dilatação tubular
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FI	Fibrose intersticial
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GS	Glomeruloesclerose
HRP	<i>Horseradish peroxidase complex</i>
IL	Interleucina
LA	Líquido amniótico

MO	Medula óssea
NTA	Necrose tubular aguda
Nx	Nefrectomia 5/6
PAS	Ácido periódico de Shiff
PBS	Phosphate Buffer Solution
PE	Ficoeritrina
PE-Cy5.5	Ficoeritrina Cy5.5
pH	Potencial hidrogênico
RCF	Força Centrífuga Relativa
RPM	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovina
vs	versus
WT-1	Gene do tumor de Wilms 1

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Trabalhos publicados com <i>time points</i> diferentes de inoculação de CT em modelo de nefrectomia 5/6	19
TABELA 2.	Anticorpos utilizados para caracterização das CTm derivadas de LA, por citometria de fluxo	25
TABELA 3.	Anticorpos utilizados na imunohistoquímica.....	40
TABELA 4.	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para o PCR em tempo real	48
TABELA 5.	Resultados dos parâmetros clínico-laboratoriais e histológicos dos animais que receberam CTmLA após 15 dias da indução da lesão renal e que foram submetidos a eutanásia após 30 dias e 60 dias de experimento.....	57
TABELA 6.	Resultados da imunohistoquímica para identificar podócitos (através da detecção de WT-1 e sinaptopodina), nos diferentes grupos	63
TABELA 7.	Resultados da imunohistoquímica para mifibroblastos (α -SMA), macrófagos (CD68) e leucócitos (CD43) nos diferentes grupos	71
TABELA 8.	Concentração das quimiocinas MCP-1 e RANTES quantificadas por multiplex no tecido renal dos animais 30 dias após cirurgia	75
TABELA 9.	Resultados da expressão gênica (PCR-tempo real) e proteica (multiplex) das citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido renal dos animais após 30 dias de experimento	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Imagem representativa da amniocentese para a obtenção de líquido amniótico	22
FIGURA 2.	Imagem representativa da inoculação de células tronco na região subcapsular renal de ratos	30
FIGURA 3.	Imagem representativa dos desenhos de estudo. A) protocolo experimental I; B) Protocolo experimental II	37
FIGURA 4.	Imagem representativa das células isoladas com formato fibroblastóide (<i>fibroblast-like colonies</i>), crescendo em colônias após coloração com giemsa. A) visão macroscópica das colônias de células; B) Visão microscópica de uma colônia celular (100x); C) Imagem representativa das células com característica fusiforme durante o cultivo celular (400x)	51
FIGURA 5.	Diferenciação das CTmLA em células da linhagem osteogênica. A) Células indiferenciadas não apresentaram nenhuma coloração; B) Coloração vermelha de alizarina para visualização de cálcio; C) Coloração resultante da atividade da fosfatase alcalina, produzida pelas células	52
FIGURA 6.	Caracterização da diferenciação adipogênica das CTm derivadas de LA. A) Células indiferenciadas não apresentaram nenhuma coloração; B e C) Vacúolos lipídicos presentes após a coloração de Oil-Red	53
FIGURA 7.	Caracterização da diferenciação condrogênica. A) Células indiferenciadas não apresentaram nenhuma coloração B) Deposição de matriz extracelular detectada após a Coloração por Alcian Blue	54
FIGURA 8.	Caracterização celular de marcadores de superfície por citometria de fluxo. CTm foram positivas para CD29, CD44, CD90 e CD105 e negativas para CD14, CD31, CD34, CD45, CD86 e CD117	55
FIGURA 9.	Localização da CTmLA no tecido renal. A, B e C) animais Nx 30 dias que receberam CTmLA humanas diretamente no tecido renal	58
FIGURA 10.	Pressão caudal nos diferentes grupos	59
FIGURA 11.	Proteinúria nos animais dos diferentes grupos	60
FIGURA 12.	Albuminúria dos animais dos diferentes grupos	61
FIGURA 13.	Porcentagem de glomeruloesclerose nos diferentes grupos	62
FIGURA 14.	Expressão gênica de WT-1, por PCR em tempo real, nos diferentes grupos	64

FIGURA 15. Expressão de WT-1 nos diferentes grupos	65
FIGURA 16. Expressão gênica da sinaptopodina, por PCR em tempo real, nos diferentes grupos	66
FIGURA 17. Expressão de sinaptopodina nos diferentes grupos experimentais	67
FIGURA 18. Porcentagem de fibrose intersticial nos diferentes grupos	68
FIGURA 19. Expressão gênica de colágeno tipo I, por PCR em tempo real, nos diferentes grupos	79
FIGURA 20. Expressão gênica de fibronectina, por PCR em tempo real, nos diferentes grupos	70
FIGURA 21. Resultados da expressão de α -SMA no tecido renal dos diferentes grupos, refletindo o número de miofibroblastos intersticiais	72
FIGURA 22. Resultados da média do número de macrófagos no interstício renal nos diferentes grupos	73
FIGURA 23. Média do número de leucócitos CD43 ⁺ no interstício renal dos diferentes animais dos diferentes grupos	74
FIGURA 24. Concentração dos marcadores MCP1 e RANTES no tecido renal dos animais dos grupos estudados	75
FIGURA 25. Expressão gênica e concentração proteica de IL-1 β , TNF- α e IL-6 no tecido renal dos animais dos grupos 30 dias	78
FIGURA 26. Expressão gênica e concentração proteica de IL-2, INF- γ , IL-4 e IL-10 no tecido renal dos animais dos grupos 30 dias	80

RESUMO

Cavaglieri RC. Terapia com células tronco derivadas do líquido amniótico humano na nefropatia crônica experimental: é possível bloquear a progressão da doença renal estabelecida? [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Células tronco mesenquimais (CTm) apresentam potencial para tratamento da doença renal pela possibilidade de promover regeneração tecidual e recuperação funcional, possivelmente por seus efeitos parácrinos. Na última década, o líquido amniótico foi descrito como uma fonte promissora de extração e isolamento de CTm. Alguns estudos mostraram o efeito renoprotetor das CTm derivadas do líquido amniótico (CTmLA) na doença renal aguda e crônica, quando inoculadas precocemente. Entretanto, ainda não foi estudado o efeito da administração de CTmLA em modelo experimental de doença renal crônica (DRC) com a lesão já estabelecida, situação esta que reproduz melhor a apresentação clínica da doença nos pacientes. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da inoculação de CTmLA na região subcapsular renal no modelo de DRC já estabelecido. As CTmLA foram obtidas de pacientes no segundo trimestre de gestação e isoladas através da sua capacidade de aderência ao plástico. A caracterização das CTm foi feita por citometria de fluxo e pela diferenciação celular *in vitro*. O modelo de DRC utilizado foi o de nefrectomia 5/6 (Nx) que, pela perda de massa renal, evolui com hipertensão arterial, proteinúria, glomeruloesclerose, fibrose intersticial e perda progressiva da função renal. Quinze dias após a indução do modelo, estas alterações já são marcantes e agravam-se com 30 dias. Foram realizados 2 protocolos experimentais: no protocolo I, os animais Nx com DRC estabelecida receberam dose única de CTmLA (5×10^5) na região subcapsular renal e foram acompanhados por 30 e 60 dias de experimento. No protocolo II, os animais Nx com DRC estabelecida receberam duas doses de CTmLA (5×10^5) na região subcapsular renal, no 15º e 30º dia após a nefrectomia 5/6, e foram acompanhados por 30 dias, totalizando 60 dias de experimento. Os animais foram subdivididos nos grupos: Sham, ratos submetidos à cirurgia fictícia; Sham+CTmLA, ratos submetidos à Sham que receberam CTmLA; Nx, ratos submetidos à nefrectomia 5/6; Nx+CTmLA, ratos Nx que receberam CTmLA. Para verificar a localização das CTmLA no tecido renal foi realizada a hibridização *in situ* para cromossomo XY. Foram realizadas análises dos parâmetros clínicos e laboratoriais, além de análise histológica, imunohistoquímica, PCR em tempo real e multiplex. Resultados: as CTmLA cultivadas mostraram grande capacidade de aderência, crescimento em colônia e de diferenciação em células osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas. A análise por citometria mostrou-se positiva para CD29, CD44, CD90 e CD105, com uma pequena população de células de CD14, CD34, CD45 e CD117, confirmando a presença preponderante de CTm. Protocolo I: Após 30 dias, a inoculação de CTmLA, dose única, preveniu a elevação da pressão arterial, da proteinúria, da glomeruloesclerose, recuperando a expressão dos marcadores de podócitos, WT-1 e sinaptopodina. Entretanto, não houve efeito benéfico nos níveis de creatinina sérica e na fibrose intersticial, após 30 e 60 dias. O tratamento com CTmLA promoveu uma diminuição marcante do número de macrófagos e uma discreta queda dos leucócitos no infiltrado inflamatório renal, além da diminuição do número de miofibroblastos no interstício renal. Citocinas pró-inflamatórias foram encontradas em menor concentração no tecido renal dos animais que receberam CTmLA (IL-1 β , TNF- α ,

MCP-1 e RANTES). Não houve alteração significativa das citocinas Th1 e Th2, exceto por um aumento da IL-4 nos animais tratados com CTmLA. Os animais que foram acompanhados por 60 dias tiveram uma melhora da proteinúria, da glomeruloesclerose, diminuição do infiltrado de macrófagos e uma melhora da expressão de WT-1. Não foram observadas diferenças estatísticas nos parâmetros de creatinina sérica e fibrose intersticial, aos 30 e 60 dias. Protocolo II: Nos animais que receberam a segunda dose de CTmLA e foram acompanhados por 60 dias observou-se prevenção da elevação da pressão arterial e da proteinúria, além de uma marcante diminuição da fibrose intersticial. Em conclusão, o presente estudo mostrou, pela primeira vez, que a terapia com CTmLA foi capaz de induzir renoproteção nos animais com doença renal crônica estabelecida. O tratamento com CTmLA pode representar uma nova abordagem terapêutica bloqueando a progressão da doença renal crônica.

Descritores: células-tronco mesenquimal; líquido amniótico; nefropatias; nefrectomia; glomérulos renais; citocinas

SUMMARY

Cavaglieri RC. Stem cell therapy in experimental chronic nephropathy: is it possible to block the progression of renal disease in the established injury? [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Mesenchymal stem cells (mSC) represent therapeutic potential for the treatment of renal diseases, due to their ability to induce tissue regeneration and functional recovery. Human amniotic fluid stem cells (AFmSC) are a class of fetal, pluripotent stem cells, which present characteristics intermediate between embryonic and adult stem cells. These cells are characterized by the expression of mesenchymal stem cells markers. In addition, they have the ability to differentiate into lineages of all embryonic germ layers. They also show high proliferative rates, but do not induce tumor formation. Therefore, AFmSC are considered to be a very promising cell source and these characteristics have generated a great interest concerning their potential renoprotective effects. The aim of this study was to analyze the effects of AFmSC in an experimental model of chronic kidney disease, the 5/6 nephrectomy model (Nx), after the disease has been established, in order to more closely resemble the clinical settings in humans. AFmSC derived from second-trimester amniocentesis were isolated by plastic adhesion. After 4-7 passages, AFmSC characteristics were confirmed by flow cytometry and by their ability to differentiate into osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages. Two experimental protocols were performed: In protocol I, rats underwent 5/6 nephrectomy (Nx) or sham surgery at day 0, received at day 15 a single dose of hAFmSC (5×10^5 cells) injected under the renal capsule and were studied at day 30 and 60 days. In protocol II, rats underwent Nx or sham surgery, and received at days 15 and 30, two doses of hAFmSC (5×10^5 cells) injected under the renal capsule, and were studied at day 60. In both protocols, the animals were subdivided into four groups: Sham, rats submitted to fictitious surgery; Sham+hAFmSC, Sham rats that received hAFmSC; Nx, rats submitted to nephrectomy 5/6; Nx+hAFmSC, Nx rats receiving hAFmSC. The hAFmSC were followed in the renal tissue by *in situ* hybridization for XY chromosome. In all the groups, clinical and histological parameters were analyzed by immunohistochemistry and real-time PCR. Results: AFmSC cultivated demonstrated an ability to adhere to plastic, to grow in colonies and to differentiate in osteogenic, adipogenic and chondrogenic cells. Quantitative analysis of cell markers by flow cytometry showed that isolated cells were positive for CD29, CD44, CD90 and CD105, with a small population of cells positive for CD14, CD34, CD45 and CD117, confirming a preponderant presence of mSC. Protocol I: After 30 days, the single dose of hAFmSC significantly reduced the blood pressure levels, proteinuria, glomerulosclerosis and improved the expression of podocytes markers, WT-1 and synaptopodin. A marked decrease on the number of macrophages and a discrete decrease of leucocyte infiltration, as well as a reduction of interstitial myofibroblasts was observed. Treatment with hAFmSC significantly reduced some proinflammatory cytokines (IL1 β , TNF- α , MCP-1 and RANTES). No significant difference in Th1 or Th2 cytokines was observed, except for IL-4 increase in Nx rats treated with hAFmSC. At 60 days of follow-up, Nx rats treated with hAFmSC presented reduced proteinuria, glomerulosclerosis and macrophages besides increase in WT-1 expression. No improvements were observed on serum creatinine and of interstitial fibrosis, after 30

and 60 days. Protocol II: Inoculation of two doses of hAFmSC in Nx rats improved blood pressure levels, proteinuria and interstitial fibrosis at day 60. In conclusion, the present study demonstrated, for the first time, that hAFmSC induced renoprotection in animals with established chronic kidney disease. Treatment with hAFmSC may represent a novel therapeutic approach for blocking the progression of chronic kidney disease.

Descriptors: mesenchymal stem cells; amniotic fluid; kidney diseases; nephrectomy; kidney glomerulus; cytokines

I. INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios da Nefrologia é conseguir interromper o processo de progressão da doença renal ou, pelo menos, retardar o tempo de evolução para a perda da função total dos rins e suas consequências, que culminam com alta morbidade e mortalidade.

De acordo com os dados do censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia, em 2016 havia 122.8250 pacientes em diálise, com uma prevalência de 592 pacientes por milhão da população (www.sbn.org.br). Embora a diálise ainda seja a terapia substitutiva predominante para os pacientes portadores de doença renal crônica (DRC), o transplante renal tem uma notável importância. No ano de 2016 foram realizados, no Brasil, 5.492 transplantes renais (www.abto.org.br), ambos os procedimentos representam alto custo para o Sistema de Saúde.

A maioria das nefropatias crônicas progressivas está diretamente relacionada às doenças comuns na população mundial, tais como hipertensão arterial e diabetes mellitus, o que caracteriza a DRC como um problema relevante de saúde pública. Além da hipertensão arterial e do diabetes, outras possíveis causas de DRC progressiva são as glomerulopatias, doenças túbulo-intersticiais, doenças renais hereditárias, entre outras.

A fisiopatologia da DRC está bem descrita na literatura, sendo a redução da massa renal uma importante causa da alteração morfofuncional, caracterizada pelo desequilíbrio hemodinâmico nos néfrons remanescentes levando-os à hiperfiltração e à hipertrofia glomerular (Brenner *et al.*, 1985; Grams & Coresh, 2013), além de alterações histológicas como a expansão da matriz mesangial levando à glomeruloesclerose (Nahas *et al.*, 1997; Nwankwo *et al.*, 2005; Barton & Sorokin,

2015). Adicionalmente, alterações intersticiais podem ser observadas, como a presença de um infiltrado leucocitário, de fibrose e atrofia tubular (Nath KA, 1992 e 1998; Eddy A., 2005; Fragiadaki & Mason, 2011; Duffield J, 2014).

A utilização de estratégias medicamentosas disponíveis atualmente para o tratamento e/ou o retardo da progressão da DRC, focam em um controle eficiente da pressão arterial e da proteinúria (Anderson *et al.*, 1985; Graciano *et al.*, 2004; Esposito *et al.*, 2009; Takakuta *et al.*, 2010; Dellê *et al.*, 2012). Dentre estas medidas, destaca-se o uso de drogas anti-hipertensivas, particularmente inibidores da enzima de conversão e bloqueadores de receptores de angiotensina II, que também têm efeito anti-proteinúrico. Além disso, o uso de imunossuppressores (corticosteroides, ciclosporina, ciclofosfamida, micofenolato mofetil) têm sido indicado em algumas situações, visando um efeito anti-inflamatório. No entanto, este tipo de intervenção tem tido sucesso apenas parcial no retardo e no bloqueio da progressão da doença (Wang *et al.*, 2013; Banki *et al.*, 2012; Graciano *et al.*, 2004; Fujihara *et al.*, 2000; Fujihara *et al.*, 2005). Assim, até o presente, não existe nenhum tratamento específico para a DRC e para os pacientes que atingem estágios avançados da doença. A única alternativa é a terapia renal substitutiva, que consiste na diálise e transplante renal.

O emprego de modelos experimentais tem permitido uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão das doenças renais e, desta forma, tem possibilitado a investigação de estratégias terapêuticas que interfiram na progressão. A redução da massa renal em 5/6 (modelo de nefrectomia 5/6) é um dos modelos experimentais mais utilizados para estudar a nefropatia crônica progressiva. Este modelo consiste na nefrectomia do rim direito e a ligadura de 2 ou 3 ramos da artéria renal do rim esquerdo. A lesão induzida por este modelo se caracteriza pelo

desenvolvimento precoce de proteinúria, hipertensão sistêmica e glomerular e infiltração de células inflamatórias (Anderson *et al.*, 1985).

Neste contexto, o modelo de nefrectomia 5/6 é interessante para ser usado na investigação do potencial das CT como uma alternativa terapêutica que possa retardar ou até mesmo bloquear a progressão da DRC.

I.1. CÉLULAS TRONCO (CT)

I.1.1. Definição de CT

As CT são células primordiais indiferenciadas e responsáveis pela formação do embrião e pela manutenção dos tecidos na vida adulta (Anglani *et al.*, 2004; Ricardo & Deane, 2005). Conceitualmente, as CT apresentam três características fundamentais: 1) autorreplicação ilimitada, ou seja, capacidade de multiplicar-se gerando cópias idênticas à célula original durante toda a vida; 2) capacidade de se diferenciar em diferentes linhagens celulares; 3) capacidade de reconstituir funcionalmente um tecido lesado (Verfaillie, 2002; Okamoto & Campos, 2004; Dominici *et al.*, 2006; Parekkadan & Milwid, 2010).

I.1.2. Classificação das CT quanto à capacidade de diferenciação

As CT são, geralmente, classificadas, de acordo com seu potencial de diferenciação em: 1) células totipotentes, que podem dar origem a todos os tecidos que formam o corpo humano, inclusive a placenta e anexos embrionários; 2) células pluripotentes, podem originar as células dos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma), mas que são incapazes de gerar placenta e anexos embrionários; 3) células multipotentes, com capacidade de diferenciar-se em quatro ou mais linhagens celulares do mesmo folheto embrionário da sua origem; 4) células

unipotentes, que conseguem diferenciar-se em um único tipo celular (Young & Black, 2004; Schena & Abbattista, 2003; Fortier, 2005).

I.1.3. Classificação das CT quanto à sua origem

I.1.3.a) Células tronco embrionárias (CTe): As CT embrionárias são CT derivadas de embriões no estágio de blastocisto. As CT embrionárias são pluripotentes, ou seja, têm a capacidade de diferenciar-se nos diversos tecidos do adulto (Martin G, 1981; Thomson *et al.*, 1998; Boyer *et al.*, 2005). As CT embrionárias expressam marcadores celulares específicos, tais como SSEA-3 e 4 (*stage specific embryonic antigen*) e TRA-1-60 (*tumor rejection antigen*), TRA-1-81 e fosfatase alcalina, que são marcadores característicos de células pluripotentes e células indiferenciadas. As CT embrionárias expressam também marcadores intracelulares (fatores de transcrição) tais como: OCT-4 (*octamer-binding transcription factor*), Nanog, SOX-2 e Rex-1. (Thomson & Marshall, 1998; Wright *et al.*, 1996; Boyer *et al.*, 2005; Bagherpoor *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2017). Apesar do potencial promissor das CTe para o tratamento de várias doenças, restrições ao seu uso terapêutico têm surgido devido aos riscos de tumorigênese e rejeição imunológica, além de haver considerações éticas quanto à sua obtenção e utilização (Thomson *et al.*, 1998; Guan *et al.*, 1999; Odorico *et al.*, 2001; Navarro-Alvarez *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2012;).

I.1.3.b) Células tronco adultas: São células tronco multipotentes presentes em praticamente todos os órgãos e tecidos pós-natal. CTa são divididas em CT hematopoiéticas (CTh) e CT mesenquimais (CTm) (Fortier, 2005; Gurkan & Akkus, 2008; Sudulaguntla *et al.*, 2016). As CTh originam todas as linhagens hematológicas e participam da reconstituição da população sanguínea. São encontradas na medula óssea

(MO), fonte clássica das CTh, onde correspondem de 0,05% a 0,1% do total de células presentes, além estarem presentes no sangue periférico, cordão umbilical e sistema hematopoiético fetal (Stockerl-Goldstein *et al.*, 2000; Locatelli *et al.*, 2006; Humeau *et al.*, 1996).

A descoberta de novos marcadores celulares possibilitou caracterizar fenotipicamente as CTh como positivas para: CD34, CD38; Sca-1; CD117, CD133 e CD150. e negativa para: CD44, CD73, Thy-1, Lin negativa, CD105 e CD135 (Quesenberry & Goldberg, 2017).

1.2. CT MESENQUIMAIS (CTm)

As CTm são células progenitoras não hematopoiéticas que podem diferenciar-se em vários tecidos mesenquimais (Dominici *et al.*, 2006). Cohnhein há 130 anos foi o primeiro a observar e sugerir a possibilidade da medula óssea ser fonte de “fibroblastos” que depositavam fibras de colágenos como parte do processo de regeneração tecidual. (Chamberlain *et al.*, 2007; Prockop, 1997).

Em 1968, Friedenstein observou que as células em cultura se tornaram mais homogêneas e com aspecto fusiforme, eram capazes de crescerem em colônias (Friedenstein *et al.*, 1976). Em 1980, Castro-Malaspina e colaboradores observaram o mesmo fenômeno em células isoladas da MO humana (Castro-Malaspina *et al.*, 1980).

Em 1991, foi demonstrado o potencial de diferenciação das células isoladas da MO em linhagem mesodérmica e, posteriormente em linhagens endodérmica e ectodérmica, sugerindo um possível papel na regeneração tecidual (Caplan, 1991; Pittenger *et al.*, 1999).

Em 2005, para definir o perfil das CTm humanas, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) propôs os seguintes critérios mínimos: 1) sejam isoladas com base nas suas propriedades de adesão à superfície plástica onde são cultivadas; 2) expressem os antígenos de superfície celular CD105, CD73 e CD90 com positividade superior a 95%, e não expressem CD45, CD34, CD14, CD11b ou, CD79α ou moléculas de superfície CD19 e HLA-DR; 3) tenham capacidade de se diferenciar *in vitro* em diversas linhagens celulares do tecido conjuntivo, incluindo osteócitos, condrócitos e adipócitos (Horwitz *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006; Horwitz & Dominici, 2008).

I.3. LÍQUIDO AMNIÓTICO – FONTE DE CTm

I.3.1. Líquido amniótico (LA)

O líquido amniótico envolve e protege o feto na cavidade amniótica, proporcionando um ambiente que permite a movimentação fetal, protege contra traumatismos e infecções, evita que o cordão umbilical fique vulnerável a fenômenos compressivos, mantém a temperatura da cavidade amniótica, auxiliando no desenvolvimento fetal (Zugaib & Nomura, 2012; Calvin & Oyen, 2007). O desenvolvimento normal dos sistemas respiratório, digestório, urinário e musculoesquelético fetais também é dependente do LA durante a gestação (Da Sacco *et al.*, 2010). A regulação do volume de LA é um processo dinâmico que depende da interação entre feto, placenta e o organismo materno. Durante a evolução da gestação, a contribuição materna diminui gradativamente e a fetal aumenta (Lotgering *et al.*, 1986).

Apesar da membrana amniótica envolvendo o embrião ser observada entre a 7^o e 8^a semanas, somente na 12^a semana verifica-se a expansão da cavidade amniótica. Com o crescimento do embrião, a cavidade amniótica também aumenta

progressivamente de tamanho para acomodar melhor o feto. A produção do LA nas primeiras semanas de gestação decorre principalmente da passagem passiva de líquidos através da membrana amniótica (Brace, 1995), com a água seguindo o gradiente osmótico. Nesse período, o líquido constitui basicamente de um ultrafiltrado do plasma materno (Abramovichi & Page, 1972).

Entre a 10^a e 20^a semana, a composição do líquido se assemelha à do plasma do sangue fetal, sendo que a homeostase entre plasma fetal e o líquido amniótico ocorre provavelmente por meio da pele (Underwood *et al.*, 2005). Ainda neste período gestacional, o rim fetal começa a produzir fluidos que levam ao volume do LA durante o segundo trimestre (Da Sacco *et al.*, 2010). Ao redor de 17 a 20 semanas de gestação, tem início a queratinização da pele fetal, que se torna impermeável, reduzindo sua participação na regulação do volume do líquido amniótico (Brace, 1995).

A partir da 20^a semana gestacional, a deglutição e a diurese fetal adquirem papel importante na dinâmica do líquido amniótico (Kurjak *et al.*, 1981). No final do primeiro trimestre, o néfron fetal apresenta capacidade de excreção de água por meio da filtração glomerular. Existem evidências de que os rins do feto funcionam desde a 14^a semana de gestação, mas sua contribuição na formação do LA inicia-se a partir da 20^a semana. Mesmo na maturação fetal, a capacidade de concentrar e modificar o pH da urina é completamente limitado, de forma que a urina fetal é hipotônica em relação ao plasma fetal, com baixa concentração de eletrólitos (Hedriana & Mopore, 1994; Jauniaux *et al.*, 2001). Neste período, a produção de urina aumenta progressivamente, sendo estimada inicialmente em 2,2 mL/hora, atingindo um volume total de 500 mL/dia para este período, 12 ml/hora em 32 semanas e 27 ml/hora a termo (Wladimiroff & Campbell, 1974; Rocha Oliveira, 2001). Outras fontes adicionais importantes do fluido

amniótico são a face fetal da placenta, o sistema respiratório, o trato gastrointestinal e o cordão umbilical (Duenhoelter *et al.*, 1976; Olver & Strang, 1974; Mescher *et al.*, 1975; Minei & Suzuki, 1976; Muller *et al.*, 1994).

O líquido amniótico é praticamente acelular até a 14^a semana de gestação. A partir de então, e até a 32^a semana, a quantidade de células aumenta progressivamente, observando-se aumento brusco na 37^a semana. As células descamadas presentes no LA são úteis há décadas no diagnóstico pré-natal, pela sua composição cromossômica e genética fetal (Zugaib, 2012). As células em suspensão são heterogêneas quanto ao formato, tamanho, razão entre citoplasma e núcleo, características citoplasmáticas, constituindo várias subpopulações que variam de acordo com a idade gestacional, refletindo assim a maturação fetal e de seus anexos (Gosden *et al.*, 1983).

Essas subpopulações são classificadas em três grupos de acordo com sua morfologia, sendo elas: células tipo-E epitelióide (células derivadas da pele do feto); células tipo-AF específica do líquido amniótico (células que produzem estrógeno e progesterona e são derivadas do tecido placentário); e célula tipo-F fibroblastoide (derivado do tecido mesenquimal fetal e do fibroblasto dermal (Hoehn *et al.*, 1975). As células que correspondes estes 3 tipos celulares são: células de descamação da epiderme, do epitélio do sistema urinário fetal, células intestinais e respiratórias, células polimorfonucleares, macrófagos e células anucleadas (Lotgering *et al.*, 1986; Gosden *et al.*, 1983).

Dentre os tipos celulares encontrados no LA, foram identificadas também CTm, representando uma fonte alternativa para a obtenção de CT para estudos de terapia celular e medicina regenerativa.

I.3.2. CTm derivadas do líquido amniótico (CTmLA)

Em 1990, dois grupos demonstraram a presença de pequenas subcategorias celulares no LA com potencial de proliferar e diferenciar. Torricelli e colaboradores foram os primeiros a descreverem a presença de células progenitoras hematopoiéticas no LA coletado primordialmente na 12^a semana de gestação (Torricelli *et al.*, 1993). Subsequentemente, Streubel e colaboradores foram capazes de diferenciar as células do LA em miócitos, sugerindo a presença de células não-hematopoiéticas no LA (Streubel *et al.*, 1996). Posteriormente, foi determinado o perfil fenotípico destas células, bem como o potencial de diferenciação em várias linhagens, como adipócitos, osteócitos ou células neuronais, dependendo das condições específicas da cultura (In't Anker *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2004). Em 2003, demonstrou-se que estas células também expressavam os fatores de transcrição OCT4 e SSEA-4, marcadores específicos de CT pluripotentes, indicando, assim, que as CTmLA apresentam também características das células embrionárias (Prusa *et al.*, 2003).

O grupo de Atala e colaboradores, em 2007 revisou a caracterização completa das CTmLA. Eles demonstraram que estas células, tanto de humanos quanto de roedores, expressavam marcadores embrionários e de células adultas. Além disso, não apresentavam variação nos telômeros e cariótipo quando mantidas em cultura e ainda eram capazes de se diferenciarem, *in vitro*, em seis linhagens celulares: adipogênica, osteogênica, miogênica, endotelial, neurogênica e hepática (De Coppi *et al.*, 2007). Em 2010, o mesmo grupo, descreveu com maiores detalhes a composição celular do LA. Eles identificaram uma população de células mesenquimais metanéficas (MM) dentro da população celular do LA, sendo que estas células MM apresentaram marcadores

específicos para as células precursoras de podócitos, células tubulares epiteliais e células mesangiais (Da Sacco *et al.*, 2010).

Em 2007, De Coppi e colaboradores, identificaram uma população celular, caracterizada pela expressão de CD117⁺ (c-kit) (aproximadamente 1% das células do LA total). Clones de células do LA c-kit⁺ foram facilmente expandidos em cultura e mais de 90% das células expressaram o fator de transcrição Oct4, sendo negativas para marcadores hematopoiéticos (De Coppi *et al.*, 2007). De acordo com Phermthai e colaboradores, esta população celular apresenta alto grau de pureza, podendo ser considerada mais segura para o uso clínico (Phermthai *et al.*, 2010).

I.3.3. Papel imunomodulador das CTmLA

Embora os mecanismos pelos quais as CTm exerçam seus efeitos biológicos ainda não tenham sido totalmente esclarecidos, diversas evidências sugerem que as CTm exercem um papel imunoprotetor, seja pelo contato célula-célula ou através de fatores solúveis com propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Uccelli *et al.*, 2007).

As primeiras evidências do papel imunoregulador das CTm vêm do trabalho de Bartholomew e colaboradores, que demonstraram que a administração intravenosa de CTm, em modelo de transplante de pele em babuínos, foi capaz de promover uma melhora na sobrevida dos enxertos alogênicos, de forma similar ao tratamento com imunossupressores (Bartholomew *et al.*, 2002).

Estudos subsequentes demonstraram que o papel das CTm no sistema imune pode estar ligado ao bloqueio das funções efectoras e da proliferação e ativação dos linfócitos T (Di Nicola *et al.*, 2002). Além disso, outros estudos sugerem que esta

imunoregulação está intimamente ligada ao aumento de células T reguladoras (Tregs), aumento de linfócitos CD4⁺ e uma polarização da resposta imune de pró para anti-inflamatória (Aggarwal & Pittenger, 2005; Nauta *et al.*, 2006).

Em modelos experimentais de DRC que receberam inoculação de CTm como tratamento foram observados fenômenos imunomoduladores como a mudança do perfil da subpopulação de macrófagos M1, conhecidos por seus efeitos pró-inflamatórios, para M2, macrófagos que possuem efeito anti-inflamatório e atuam no remodelamento tecidual. Outro fenômeno analisado foi a polarização dos linfócitos T do infiltrado inflamatório dos animais tratados, de Th1, população considerada pró-inflamatória, para Th2, considerada predominantemente anti-inflamatória, acompanhada da diminuição da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , bem como do TGF- β e aumento da expressão das citocinas, com efeito predominantemente anti-inflamatório, IL-4 e IL-10 (Semedo *et al.*, 2009).

Utilizando um modelo experimental de necrose tubular aguda, Perin e colaboradores mostraram que a expressão de citocinas inflamatórias é fortemente regulada pela inoculação de CTmLA (Perin *et al.*, 2010). A redução da expressão de moléculas pró-inflamatórias e a alta regulação das citocinas pró-regenerativas resultou em uma regeneração mais rápida da injúria renal com maior taxa de proliferação das células tubulares, menor apoptose e melhora nos parâmetros fisiológicos renais. Corroborando com este estudo, Yoon e colaboradores analisaram *in vitro* as citocinas produzidas pelas CTmLA, cultivadas em situação normal, e observaram a presença de diversas moléculas inflamatórias, tais como IL-8, IL-6, TGF- β , VEGF e outras moléculas envolvidas na via TGF β /SMAD (Yoon *et al.*, 2010).

I.4. TERAPIA COM CT NA DOENÇA RENAL

Estudos em modelos experimentais de doença renal demonstraram o potencial efeito renoprotetor desta terapia celular além de na regeneração e recuperação da lesão renal.

I.4.1. Efeitos da administração de CT em modelos experimentais de IRA

As CTm aparecem como medida promissora para o tratamento da IRA, pois podem atuar em diversas vias da fisiopatologia da disfunção orgânica. Os mecanismos pelas quais elas agem ainda precisam ser elucidados. Já é sabido que estas células podem agir tanto por ação parácrina quanto endócrina, por meio da produção de fatores de crescimento e citocinas que, por sua vez, agem modulando a resposta imune. Morigi e colaboradores, foram os primeiros a analisar o papel renoprotetor das CTm e a documentar seu potencial terapêutico. Em modelo de IRA induzido por cisplatina, as CTm induziram proteção da função renal e da lesão tubular, enquanto o uso de CTh (Lin^- , cKit^+) não apresentou efeitos benéficos contra a injúria renal (Morigi *et al.*, 2004).

A alta capacidade renoprotetora de CTm também foi documentada em modelos de isquemia/reperfusão, promovendo aumento significativo na proliferação de células tubulares proximais, redução do número de túbulos afetados por necrose ou apoptose e recuperação acelerada da função renal (Lange *et al.*, 2005; Tögel *et al.*, 2005; Semedo *et al.*, 2007). Além disso, a administração de CTm em pacientes, tanto autólogas como alogênicas, foram seguras e eficazes em IRA (Tögel *et al.*, 2009).

Em camundongos diabéticos imunodeficientes (NOD/SCID), a inoculação de CTm de cordão umbilical (CTmCU) (5×10^5 células/animal) protegeu contra o comprometimento da função renal e da lesão tubular. Além disso, a inoculação de

CTmCU aumentou a sobrevivência dos animais quando comparada à inoculação de CTmMO (Morigi *et al.*, 2010).

No mesmo modelo de isquemia e reperfusão, CTm de tecido adiposo (TA) levaram à melhora da função renal, com aumento da depuração da creatinina, melhora do estresse oxidativo e da lesão no córtex e medula renal (Sheashaa *et al.*, 2016). Os autores também descreveram a ocorrência de modulação da resposta inflamatória com a supressão da expressão de IL-1 β , TNF- α e proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP) (Chen *et al.*, 2011; Furuichi *et al.*, 2012).

As CTm secretam um amplo espectro de fatores de crescimento. Tögel e colaboradores sugerem que VEGF pode ser considerado um fator crítico na renoproteção oferecida pelas CTm (Tögel *et al.*, 2007). O VEGF, o HGF e o IGF-1 secretados por CTm derivadas da MO contribuem para reparar a lesão renal através da estimulação da mitose, proliferação e diferenciação de CT residentes e angiogênese (Tögel *et al.*, 2005; Tögel *et al.*, 2007; Semedo *et al.*, 2009). A produção local dos fatores de crescimento pelas CTm no tecido lesado provavelmente explica a superioridade das CTm nos modelos de IRA experimental.

I.4.2. Efeitos da administração de CT em modelos experimentais de nefropatia crônica

Embora estudos em animais envolvendo modelos de I/R ou indução química de IRA tenham demonstrado melhora consistente após a infusão de CTm, a sua eficácia em modelos de lesão renal crônica é menos clara.

Foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que o uso de CTm derivadas da MO em modelo de nefropatia crônica progressiva por nefrectomia 5/6 bloqueou a

progressão da doença renal (Cavaglieri *et al.*, 2009). Constatamos que a inoculação de CTm promoveu efeitos renoprotetores, com melhora da hipertensão arterial, proteinúria, albuminúria, diminuição da creatinina sérica, além da melhora dos parâmetros histológicos, efeitos já detectados após 15 dias da indução da lesão e mais consistentes depois de 30 dias. Resultados semelhantes foram descritos por outros grupos que também demonstraram uma marcante melhora da função renal (Caldas *et al.*, 2008; Caldas *et al.*, 2015), histologia renal (Choi *et al.*, 2009; Semedo *et al.*, 2009; Caldas *et al.*, 2015) e infiltrado leucocitário (Villanueva *et al.*, 2011; Caldas *et al.*, 2015). Além disso, Semedo e colaboradores demonstraram que o tratamento com CTmMO pode modular a resposta inflamatória, bem como possuem propriedades imunossupressoras e de remodelamento tecidual (Semedo *et al.*, 2009).

Bian e colaboradores observaram no modelo de nefrectomia 5/6 que, ao inocularem uma única dose de CTm derivadas da MO em diferentes tempos (4, 8, 12 e 16 semanas), os animais apresentavam uma melhora da função renal e da lesão histológica (glomeruloesclerose e lesão tubulointersticial) somente nos animais que receberam as células com 4 ou 8 semanas após a nefrectomia (Bian *et al.*, 2014).

Em modelo nefrectomia unilateral com sobrecarga protéica associado à, Wu e seus colaboradores examinaram a expressão dos marcadores inflamatórios CCL2 e CCL5. Animais doentes expressaram mais CCL2 e CCL5 nas células tubulares. A inoculação intravenosa das CTm derivadas da MO uma vez por semana, durante um mês, atenuou a expressão e diminuiu a presença das proteínas nos túbulos. Em estudo *in vitro*, células tubulares renais depois de estimuladas com albumina de soro humano apresentaram aumento marcante da expressão de reguladores da inflamação e fibrose, HGF e TSG-6. Ao serem co-cultivadas com CTm, verificou-se redução da expressão

destes fatores, sugerindo um possível mecanismo para o reparo renal promovido pela CTm (Wu *et al.*, 2014).

Em modelo de transplante renal com rejeição crônica, a inoculação de CTm derivadas da MO injetadas na veia caudal na 11^a semana após o transplante induziu uma melhora da histologia renal, fibrose intersticial e atrofia tubular, bem como uma melhora da infiltração leucocitária. Citocinas inflamatórias e pró-fibróticas tecidual estavam diminuídas nos animais que receberam tratamento com CT, indicando assim um efeito benéfico das CTm derivadas da MO, provavelmente resultante de suas propriedades imunomoduladoras (Franquesa *et al.*, 2012).

I.4.3. Efeitos da administração de CTmLA na doença renal

O potencial uso das CTmLA como terapia para doenças renais vem sendo explorado em alguns estudos experimentais nos últimos anos, com resultados animadores.

Recentemente, Perin e colaboradores mostraram a capacidade das CTmLA humanas, inoculadas no rim embrionário de rato cultivado *ex vivo*, de se integrarem às estruturas renais primordiais (Perin *et al.*, 2007). O mesmo grupo demonstrou, *in vivo*, a participação das CTmLA humanas na regeneração renal, em modelo de necrose tubular aguda. Histologicamente, foi visto uma diminuição do número de células tubulares necrosadas, redução da apoptose e aumento da proliferação de células epiteliais tubulares. De acordo com os autores, o principal mecanismo de ação da CTmLA é sua habilidade em modular a resposta imune, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, estimulando a expressão de moléculas anti-inflamatórias e diminuindo o índice apoptótico (Perin *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram descritos pelo

grupo de Hauser e colaboradores, que constataram uma diminuição de células apoptóticas bem como uma maior atividade proliferativa das células tubulares (Hauser *et al.*, 2010). Al-Husseiny e colaboradores demonstraram uma melhora da função renal no modelo de nefrotoxicidade induzida por cisplatina. Além disso, o uso de CTmLA diminuiu significativamente a injúria renal (necrose tubular, atrofia, infiltrado inflamatório), com marcantes mudanças regenerativas no tecido (Al-Husseiny *et al.*, 2016).

Em modelo de nefropatia diabética, Rota e colaboradores demonstraram que a inoculação de CTmLA leva à melhora da lesão e da função tubular, com efeitos antiapoptóticos e de proliferação tubular, resultando num aumento da sobrevivência dos animais. É importante notar que as CTmLA inoculadas foram encontradas predominantemente nas regiões peritubulares, e não expressavam marcadores epiteliais. Ou seja, o efeito sobre a lesão não foi resultado de diferenciação celular, mas provavelmente da liberação local de IL-6, VEGF e SDF-1 (Rota *et al.*, 2012).

O uso de CTmLA em modelo de DRC ainda é limitado. Entretanto, os resultados são promissores. Em modelo de síndrome de Alport (camundongos colágeno 4 α 5^{-/-}), a administração intracardíaca de CTmLA antes do início da proteinúria retardou a perda da função renal e diminuiu a glomeruloesclerose e fibrose intersticial. Além disso, nos animais tratados, houve diminuição do recrutamento e ativação de macrófagos tipo M1 e aumento na proporção de macrófagos tipo M2/M1. As CTmLA não se diferenciaram em podócito, indicando que o efeito positivo na membrana basal ocorreu através da modulação parácrina (Sedrakyan *et al.*, 2012).

No modelo de obstrução unilateral de ureter, a inoculação de CTmLA na veia caudal levou ao aumento da expressão de E-caderina, importante molécula utilizada

para avaliar a integridade tubular. A expressão de MCP-1 foi reduzida, indicando que as CTmLA contribuem para atenuar a inflamação e a fibrose intersticial renal (Sun *et al.*, 2013).

Em 2011, nosso grupo mostrou em animais submetidos à Nx 5/6 com DRC, que CTmLA inoculadas na cápsula renal proporcionaram um efeito renoprotetor, caracterizado por significativa redução da pressão caudal, proteinúria, glomeruloesclerose, infiltrado de macrófagos e miofibroblastos. Além disso, ao compararmos os tratamentos com CTmLA e CTm derivadas da MO, constatamos que as CTmLA foram mais eficientes em diminuir o infiltrado de macrófagos e reduzir a presença de miofibroblastos no tecido (Noronha *et al.*, 2011).

II. RACIONAL

Apesar dos resultados benéficos observados com o uso de CT na doença renal, é fundamental avançar na compreensão dos mecanismos envolvidos e dos seus efeitos biológicos para solidificar sua possível aplicação na prática clínica. Inúmeras questões continuam abertas: o momento ideal para inocular as CT, a melhor via de inoculação para que as células migrem e alcancem o local com lesão, o número necessário de células para que elas exerçam seus efeitos biológicos e o número de doses a ser injetado. Todas estas questões são importantes e ainda estão sendo investigadas.

Considerando apenas a questão do momento ideal de inoculação, Ninichuk e colaboradores (Ninichuk *et al.*, 2006) observaram que a inoculação de CTm em animais com Síndrome de Alport 6 semanas após o nascimento contribuiu para retardar a

formação de fibrose intersticial, mas não impediu a progressão da DRC. Kunter e colaboradores (Kunter *et al.*, 2007) administraram CTm 48 horas após a indução da glomerulonefrite experimental (modelo de Thy 1.1 que induz mesangiólise) constataram que houve preservação glomerular, bem como da função renal.

Vários trabalhos estudaram o efeito de CT em modelo de Nx 5/6, em situações diversas. Na tabela 1, estão relacionadas algumas destas publicações. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório, administrando CTm no momento da indução da DRC, ou seja, no mesmo dia do procedimento cirúrgico de nefrectomia 5/6, mostraram que as CT, tanto derivadas da MO (Cavaglieri *et al.*, 2009) quanto derivadas do LA (Noronha *et al.*, 2011), apresentaram efeitos renoprotetores contribuindo para o bloqueio da progressão da DRC.

Para melhor reproduzir a situação clínica do paciente com nefropatia crônica progressiva, o presente estudo foi desenhado para infundir CT após o estabelecimento da DRC experimental. Assim, foi induzido o modelo de nefrectomia 5/6 e só após 15 dias da indução, com a comprovação da doença instalada, foram iniciados os tratamentos com CTmLA, administradas na região subcapsular renal, sendo os animais acompanhados por mais 30 ou 60 dias. Além disso, o protocolo experimental se propôs a analisar o efeito da administração de 1 dose *versus* 2 doses de CTmLA.

TABELA 1. Trabalhos publicados com *time points* diferentes de inoculação de CT em modelo de nefrectomia 5/6

ANO	AUTOR	TIPO CELULAR	TIME POINT	Nº DE CÉLULA	VIA DE INÓCULO	PRINCIPAIS ACHADOS
2009	Cavaglieri <i>et al</i>	CTmMO	Dia 0	0,2x10 ⁶	Região subcapsular renal	↓ Proteinúria Creatinina sérica Glomerulosclerose
2009	Choi <i>et al</i>	CTmMO	1º dia	1,0x10 ⁶	Veia Caudal	Melhora da Proteinúria Glomerulosclerose
2009	Semedo <i>et al</i> *	CTmMO	15º dia	0,2x10 ⁶	Veia Caudal	Melhora da função renal ↓ Glomerulosclerose Fibrose Interst.
2010	Lee <i>et al</i>	CTmMO	1º dia	3,0x10 ⁶	Veia Caudal	↓ Glomerulosclerose Macrófago
2011	Noronha <i>et al</i>	CTmLA	Dia 0	0,5x10 ⁶	Região subcapsular renal	↓ Proteinúria Macrófago Miofibroblasto
2011	Villanueva <i>et al</i> *	CTmTA	Dia 0	0,5x10 ⁶	Veia Caudal	Creatinina Sérica ↓ Proteinúria Macrófago Miofibroblasto
2012	He <i>et al</i>	CTmMO	2º dia	1,0x10 ⁶	Veia Caudal	Creatinina Sérica ↓ Proteinúria Fibrose Interst.
2014	Bian <i>et al</i> *	CTm	4^a 8^a 12^a 16^a semana	10,0x10 ⁶	Veia Caudal	4 ^a e 8 ^a semana Melhora da Função renal ↓ Glomerulosclerose Fibrose Interst.
2015	Caldas <i>et al</i>	CTmMO	1º dia	1,0x10 ⁶	Parênquima	Melhora da função renal ↓ Glomerulosclerose

* Infarto de duas artérias renais do rim esquerdo e após 7 dias foi realizado a nefrectomia do rim direito

III. OBJETIVO

O objetivo do presente projeto foi estudar, no modelo experimental de DRC (nephrectomia 5/6) com a doença já instalada, o possível efeito terapêutico das células tronco mesenquimais derivadas do líquido amniótico (CTmLA), inoculadas diretamente na região subcapsular renal.

Mais detalhadamente, os objetivos podem ser descritos como:

- 1) Avaliar o efeito da administração de CTmLA na DRC instalada através da análise de parâmetros clínico-laboratoriais relacionados à função renal (pressão arterial, proteinúria e creatinina sérica), parâmetros histológicos renais (glomeruloesclerose e fibrose intersticial) e marcadores de podócitos (através da expressão de WT-1 e sinaptopodina) e marcadores de matriz extracelular (colágeno tipo I e fibronectina).
- 2) Avaliar o efeito da inoculação de CTmLA no mecanismo celular, através da análise do número de macrófagos (ED-1), leucócitos (CD43) e miofibroblastos (α -SMA).
- 3) Analisar o efeito da administração de CTmLA nos mecanismos inflamatórios no tecido renal, utilizando a técnica de PCR em tempo real e multiplex/luminex, investigando as proteínas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ , bem como MCP-1 e RANTES, e as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10.
- 4) Comparar o efeito da administração de 1 dose *versus* 2 doses de CTmLA (no 15° e 30° dia após a Nx) sobre os mesmos parâmetros clínicos-laboratoriais citados acima.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO (AMNIOCENTESE)

As amostras de líquido amniótico (LA) foram obtidas de pacientes submetidas aos exames de cariotipagem no segundo trimestre (16^a a 20^a semana) de gestação no ambulatório do Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da FMUSP. O cariótipo normal do feto foi observado como condição primária para inclusão no projeto.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a aprovação da Comissão Interna para Avaliação de Projetos de Pesquisa (CIAPP) da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (424/15) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, o que inclui a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP) (132/15). Todas as pacientes envolvidas neste projeto receberam o termo de consentimento livre e esclarecido conforme as normas da Comissão de Ética.

Foi realizada uma ultrassonografia para confirmar a idade gestacional, a localização da placenta, o volume de líquido amniótico, morfologia e vitalidade do feto. Após este exame inicial, foi realizada uma antissepsia do abdômen materno com iodopovidona tópica para evitar possíveis infecções e contaminações da amostra. O procedimento de amniocentese foi realizado conforme esquematizado na figura 1, e para tal, as pacientes em posição de decúbito dorsal horizontal durante todo o procedimento. Segundo Crespigny e colaboradores (Crespigny *et al.*, 1990), a utilização de anestesia

local não é necessária, visto que 96% das pacientes submetidas à amniocentese não reportaram dor durante e após o procedimento.

FIGURA 1. Imagem representativa da amniocentese para a obtenção de líquido amniótico

A punção foi realizada com a utilização de uma agulha calibre 20 ou 22 *gauge* e seringa descartável de 20 mL, sempre guiada por ultrassonografia e, preferencialmente, sem que houvesse transfixação da placenta. A agulha foi inserida através da parede abdominal e da parede uterina, atingindo a cavidade amniótica, sempre com o seu trajeto monitorado pela ultrassonografia, na procura de um grande bolsão de líquido, distante do feto, de modo a preservá-lo. Após localizá-lo, a guia da agulha foi retirada, conectada à seringa, iniciando-se assim aspiração da amostra. A primeira amostra foi desprezada para evitar a contaminação com sangue materno e a segunda amostra, cujo volume aspirado foi de aproximadamente 30 mL, foi dividida em duas partes, uma para a realização de cariotipagem (10 mL) e a outra (10-20 mL) utilizada nesse estudo para o isolamento das CT.

A agulha foi retirada concomitantemente a uma avaliação por ultrassonografia, e certificação da ausência de sangramento. Ao fim do procedimento, a paciente permaneceu em repouso para recuperação e foi orientada a respeito dos possíveis sintomas pós-procedimento como dor, febre, perda de líquido ou sangramento.

IV.2. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS CTmLA

IV.2.1. Cultivo e expansão das CTmLA

As CTmLA foram isoladas e processadas em parceria com o Prof. Dr. Sergio Bydlowski, responsável pelo Laboratório de Genética e Hematologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, conforme protocolo estabelecido pelo próprio laboratório (Janz *et al*, 2012).

A amostra de LA contida na seringa foi transferida para um tubo Falcon® de 50 mL (Gibco, NY, EUA) e centrifugada a 450 RCF por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, o botão celular foi desfeito, lavado com 20 mL de PBS estéril (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 7,1 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM) e novamente centrifugado, para remoção do LA residual.

Após a lavagem, o sobrenadante foi novamente descartado e o botão celular formado foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura. Uma alíquota desta suspensão foi separada para contagem celular utilizando o corante de exclusão azul de tripan (Gibco, NY, EUA) que tem propriedades lipofílicas e penetra pela membrana das células não-viáveis (mortas), diferenciando-as das células viáveis (vivas). Desta suspensão, 10 µL foram transferidos para um microtubo de 1 mL que continha 90 µL de azul de tripan com azida sódica a 0,01%. O tubo foi homogenizado e 10 µL da diluição foram colocados em cada face de uma câmara do hemocítômetro. Foram contados 16

campos, onde se contavam as células não coradas de azul. A média desses campos foi multiplicada por 10 (diluição com tripan) e por 10^4 (fator do hemocítmetro). Assim, se obtinha o número de células viáveis para prosseguir o experimento.

Para o cultivo e expansão as CT foram transferidas para garrafas plásticas, específicas para o cultivo celular, com 75cm^2 de área, e incubadas a 37°C com 5% de CO_2 , na presença de meio de cultura α -MEM contendo 16% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de uma solução de antibiótico (100U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina). Após 72h de incubação, quando as células desejadas já haviam aderido ao plástico, o meio de cultura das garrafas foi descartado, carregando consigo as células não aderentes e substituído por um novo meio com a mesma composição. O cultivo celular foi monitorado sob microscopia invertida, com trocas do meio de cultura a cada 3 dias e, após as células atingirem confluência de aproximadamente 80%, foram tripsinizadas, contadas e replaqueadas para a expansão celular.

IV.2.2. Método de tripsinização celular

Após atingirem 80% de confluência, com crescimento em colônia e morfologia fibroblastóide, o meio de cultura foi desprezado e as células foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos, com PBS estéril, para retirar por completo o SFB. Em seguida, foram adicionados 3 mL de tripsina (Gibco-Invitrogen, Rockville, EUA) com 1 mM EDTA por garrafa e as células foram incubadas a 37°C por 3 minutos. As garrafas foram agitadas levemente para o desprendimento total das células e em seguida, para inibir a ação da tripsina, foi adicionado meio de cultura suplementado com SFB. As células em suspensão foram transferidas para tubos cônicos (Corning, Corning, NY, EUA) de 15mL e centrifugados (1600rpm por 5 minutos a 4°C). O sobrenadante foi desprezado e o botão celular foi ressuspensionado em 1mL de meio de cultura completo. O número de

células viáveis foi determinado utilizando a coloração de azul de tripan, e a partir dessa contagem as CT foram replaqueadas. O processo de tripsinização e replaqueamento das células é designado como passagem celular. As células foram cultivadas para uso entre a 4ª e a 8ª passagem.

IV.2.3. Caracterização das CTmLA por citometria de fluxo

A caracterização fenotípica das células aderentes isoladas das amostras de LA foi realizada por citometria de fluxo. Os antígenos de superfície expressos pelas células foram identificados com o uso de anticorpos monoclonais conjugados a um fluorocromo, sendo ele isotiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*), ficoeritina (PE, *phycoeritin*) ou ficoeritina-Cy 5.5 (PE-Cy 5.5, *phycoeritin-Cy 5.5*). Todos os anticorpos utilizados (adquiridos das empresas Caltag, Invitrogen, Brasil, e eBioscience, Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA, EUA) estão descritos na tabela 2.

TABELA 2. Anticorpos utilizados para caracterização das CTm derivadas de LA, por citometria de fluxo

ANTICORPOS	ESPECIFICIDADE	FLUOROCROMO CONJUGADO	ISOTIPO	DILUIÇÃO
Anti-CD29	CTm	PE	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD44	CTm	APC	Camundongo IgG2β	1:100
Anti-CD90	CTm	PE	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD105	CTm	PE-Cy7	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD45	Pan-leucocitário	FITC	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD14	Monócito	PE	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD86	Linfócitos T	FITC	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD31	Endotelial	FITC	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD34	CTh	APC	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD117	CTh	PE	Camundongo IgG1	1:100

Controles de marcações inespecíficas foram utilizados para a calibração do aparelho e análise dos resultados. Beads marcadas com anticorpos conjugados com cada fluorocromo foram utilizadas para a compensação, evitando falsos positivos devidos a inevitáveis pequenas sobreposições dos espectros de emissão dos fluorocromos utilizados.

As células obtidas e quantificadas como descritas anteriormente foram ajustadas para a concentração de $2,5 \times 10^6$ por mL. Desta suspensão 100µL foram transferidos para tubos específicos para citometria (Becton Dickinson, San Jose, EUA), previamente identificados, e incubadas com os anticorpos conjugados aos fluorocromos, por um período de 30 minutos, em campo escuro a 4° C. Em seguida, 1 mL de PBS foi acrescentado a cada tubo e os tubos foram centrifugados (2000 rpm, por 6 minutos, a 4° C). O sobrenadante foi descartado por inversão e as células ressuspendidas em 500µL de solução de 1% de formaldeído em PBS e mantidas sob-refrigeração, ao abrigo da luz, até o momento da aquisição, dentro de no máximo 24 horas.

Para cada amostra, uma aquisição de 20.000 eventos foi realizada, com a intensidade de fluorescência captada pelo citômetro de fluxo no aparelho FacsCanto (Becton Dickinson, San Jose, EUA) e os dados foram analisados no programa CELLQuest™ (Becton Dickinson, San Jose, EUA). Os resultados foram fornecidos e analisados na forma de histogramas e em percentual da população celular com reação positiva para cada anticorpo.

IV.2.4. Diferenciação das CTmLA *in vitro*

Foram realizados ensaios de diferenciação das CTm para linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica utilizando os kits StemPro (Gibco by Life Technologies, Carlsbad, EUA) conforme os protocolos do fabricante. Resumidamente,

as células foram cultivadas em placas de 6 poços até atingirem aproximadamente 60% de confluência, quando o meio de cultivo foi substituído pelo meio de crescimento e, após 4 dias foi trocado novamente pelo meio de indução de diferenciação adequado pelo tempo indicado de acordo com a diferenciação, osteogênica, adipogênica ou condrogênica. As células foram então fixadas e coradas de acordo com o protocolo descrito abaixo.

IV.2.4.a) Diferenciação osteogênica: A diferenciação osteogênica de CTmLA foi executada seguindo o protocolo de Morigi e colaboradores (Morigi *et al*, 2004). As células aderentes foram cultivadas em placas de 6 poços na densidade celular de 5×10^3 cells/mL, com meio *DMEM-low glucose* mais SFB a 10%, acrescido de GlutaMax-I (200mM) e gentamicina (10mg/mL) por 4 dias. A seguir foi realizada a substituição do meio de cultura por um meio condicionado, próprio para diferenciação osteogênica STEMPRO® *Osteocyte Differentiation Basal Medium*, STEMPRO® *Osteogenesis Supplement* e gentamicina (10mg/mL). A troca de meio de diferenciação foi realizada a cada 3 dias pelo período de 21 dias. A placa foi mantida em estufa úmida a 37° C, a 5% de CO₂. Depois de completar o período de incubação, as células foram lavadas com PBS por 5 minutos e, em seguida, fixadas em paraformaldeído a 4% durante 30 minutos, lavadas com água destilada e coradas com vermelho de alizarina (2g em 100mL de água destilada), em pH 4,2 (A5533; Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), durante 5 a 10 minutos e cuidadosamente lavadas com PBS. Os depósitos de cálcio produzidos pelas células foram visualizadas pela coloração avermelhada intensa.

IV.2.4.b) Diferenciação adipogênica: A técnica para diferenciação adipogênica de cultura de CTmLA foi realizada a partir de diferentes protocolos testados em nosso laboratório. As células foram colocadas em placas de 6 poços, na concentração de 5 x

10^3 células por poço e mantidas em meio de crescimento *DMEM-low glucose* mais SFB a 10%, acrescido de GlutaMax-I (200mM) e gentamicina (10mg/mL), por 4 dias, até atingirem a confluência de 80%. A partir daí adicionou-se o meio de diferenciação STEMPRO® *Adipocyte Differentiation Basal Medium* e STEMPRO® *Adipogenesis Supplement* com 5µg/mL de gentamicina. As trocas do meio foram realizadas a cada três dias, pelo período de 14 dias. Depois de completado o período de incubação, as células foram fixadas com formalina 4%, por 30 minutos e lavadas com PBS. Posteriormente, as células foram incubadas por 10 minutos com Oil Red 0,5% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) para coloração. Os acúmulos lipídicos citoplasmáticos foram evidenciados na cor vermelha.

IV.2.4.c) Diferenciação condrogênica: A diferenciação condrogênica das CTmLA ocorreu de forma semelhante à adipogênica. As células foram colocadas na concentração de 5×10^3 em placas de 6 poços e mantidas em meio de crescimento *DMEM-low glucose* mais SFB a 10%, acrescido de GlutaMax-I (2mM) e gentamicina (10mg/mL), por 4 dias. Ao atingirem a confluência de 80%, o meio de cultura foi substituído por um meio de diferenciação STEMPRO® *Condrocyte Differentiation Basal Medium* (1X), STEMPRO® *Chondrogenesis Supplement* (1X) e gentamicina (10mg/mL). As trocas do meio foram feitas a cada 3 dias, pelo período de 14 dias. Após o período de incubação, as células foram fixadas com formalina 4%, por 30 minutos e lavadas com PBS. Posteriormente as células foram incubadas por 10 minutos com Alien Blue (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) para coloração. A coloração em azul indicará a síntese de proteoglicanos pelos condrócitos.

IV.3. MODELO EXPERIMENTAL DE DRC: MODELO DE NEFRECTOMIA 5/6

Este projeto foi realizado mediante aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (132/15).

Previamente ao início do procedimento cirúrgico, os ratos Wistar machos foram pesados e então foram anestesiados por meio da injeção intraperitoneal de uma solução de associação de cetamina (Ketamin-S, Cristália, Brasil), na dose de 35,6mg/kg, e xilazina (Rompun, Bayer, Leverkusen, Alemanha) na dose de 5,7 mg/Kg. Em seguida, foi realizada a tricotomia da região abdominal e assepsia com álcool iodado a 2%. A laparotomia ventral longitudinal mediana, de aproximadamente 5cm, foi realizada com o auxílio de uma tesoura romba-romba. Em seguida, com a cavidade abdominal aberta, as vísceras foram rebatidas permitindo a exposição dos rins para a dissecação da artéria renal esquerda. Dois ou três ramos da artéria renal esquerda foram ligados com fio de nylon 9-0. Em seguida, as vísceras foram rebatidas para o outro lado do abdômen para a realização da nefrectomia direita. A artéria e a veia renal direita foram ligadas com fio de algodão 4-0 e em seguida o rim foi retirado. As vísceras foram recolocadas na cavidade abdominal e hidratadas com 3 ml de solução fisiológica. Para a sutura da musculatura abdominal foi usado fio cromado 3-0, utilizando ponto separado simples. A sutura da pele foi realizada com fio de algodão 4-0.

Os animais usados para controle da nefrectomia, designados como Sham, também passaram pela pesagem, anestesia, laparotomia. Suas vísceras foram rebatidas, seus rins e artérias renais foram manipulados. Suas vísceras foram recolocadas na cavidade abdominal, hidratadas e então foram realizadas as suturas da musculatura e da pele dos animais.

Ao término do procedimento cirúrgico, os ratos foram mantidos em gaiolas de plástico forradas com maravalha sob aquecimento com lâmpada incandescente, por uma noite com ração própria para roedores e água à vontade. Após esse período os animais foram alojados em gaiolas comportando até 5 ratos, mantidos à temperatura de 22 C°, num ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração padrão obtida comercialmente da empresa NUVITAL (Colombo, Brasil) e água *ad libitum*.

IV.4. INOCULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CTmLA NO TECIDO RENAL

IV.4.1. Inoculação das CTmLA na região subcapsular renal

Os animais receptores foram anestesiados como descrito anteriormente e submetidos à lombotomia esquerda. O rim esquerdo foi acessado e um corte de 5 mm foi realizado na cápsula renal. A inoculação das CTmLA foi realizada com o auxílio de um capilar de plástico estéril colocado sob a cápsula renal, e as CTmLA (1×10^5 cel em 10 μ L) foram injetadas com o auxílio de um micro injetor, constituído de uma seringa de vidro de 1mL acoplada a uma escala de 0,001mm. A incisão da lombotomia do animal foi suturada com fio de seda 5,0 (Figura 2).

FIGURA 2. Imagem representativa da inoculação de CT na região subcapsular renal de ratos

IV.4.2. Hibridização *in situ* “FISH”

A técnica foi realizada de acordo com o protocolo do kit para Cromossomo Y e X (#Z-2120-200 da empresa Zytovision, Bremerhaven, Alemanha). As lâminas foram tratadas em tampão PBS, formalina e série alcoólica gelada. A desnaturação dos cromossomos foi realizada em solução de 70% formamida/SSC 2x em banho maria a 72° C. Em seguida, as lâminas foram colocadas no termociclador a 85° C por 5 minutos, e transferida para gelo imediatamente. Após 5 minutos a lâmina foi coberta com lamínula de plástico e seladas com Rubber Cement (Elmer's). O processo de hibridização foi realizado no ThermoBryte™ (ThermoFisher) a 37° C, por 24 horas. Após esse período foram conduzidas as lavagens de estringência em três soluções de formamida 50%/SSC 2x e em uma de SSC 2x a 45° C, por 5 min cada. As lâminas foram contra coradas com DAPI, montadas com glicerol 40%/PBS, lamínula de vidro, seladas com esmalte incolor e analisadas em microscópio de epifluorescência. Os sinais de hibridização para as sequencias do satélite alfa do centrômero do cromossomo X aparecem como sinais de fluorescência verde e para o cromossomo Y aparecem em sinais fluorescentes de cor-de-laranja.

IV.5. PROTOCOLOS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Protocolo I - Efeito de 1 dose de CTmLA em DRC instalada

Sham (15d)	Ratos submetidos à cirurgia, sem doença renal e sacrificados 15 dias após a cirurgia (n=10);
Nx (15d)	Ratos submetidos à nefrectomia 5/6 para o desenvolvimento da DRC e sacrificados 15 dias após a cirurgia (n= 10);
Sham (30d)	Ratos submetidos à cirurgia, sem doença renal e sacrificados 30 dias após a cirurgia (n=16);
Sham+CTmLA (30d)	Ratos Sham que receberam CTm no 15º após a nefrectomia e sacrificados 30 dias após a cirurgia (n=6);
Nx (30d)	Ratos submetidos à nefrectomia 5/6 para o desenvolvimento de DRC doença renal crônica e sacrificados 30 dias após cirurgia (n=20);
Nx+CTmLA (30d)	Ratos Nx que receberam CTm no 15º dia após a nefrectomia e sacrificados 30 dias após a cirurgia (n=20);
Sham+PBS 1 dose (60d)	Ratos Sham que receberam PBS na região subcapsular renal, no 15º dia e foram sacrificados 60 dias após a cirurgia (n=7);
Nx+PBS 1 dose (60d)	Ratos Nx que receberam PBS na região subcapsular renal, no 15º dia e foram sacrificados 60 dias após a cirurgia (n=7);
Nx+CTmLA 1 dose (60d)	Ratos Nx que receberam CTmLA na região subcapsular renal, no 15º dia e foram sacrificados 60 dias após cirurgia (n=7).

Protocolo II - Efeito de 2 doses de CTmLA em DRC instalada

Sham 2 doses (60d)	Ratos Sham que receberam PBS na região subcapsular renal, no 15º e 30º dia e foram sacrificados 60 dias após a cirurgia (n=7);
Nx 2 doses (60d)	Ratos Nx que receberam PBS na região subcapsular renal, no 15º e 30º dia e foram sacrificados 60 dias após a cirurgia (n=7);
Nx+CTmLA 2 doses(60d)	Ratos Nx que receberam CTmLA na região subcapsular renal, no 15º e 30º dia e foram sacrificados 60 dias após cirurgia (n=7).

IV.6. DESENHO DO ESTUDO

Protocolo I - Efeito de 1 dose de CTmLA em DRC instalada

Protocolo II - Efeito de 2 doses de CTmLA em DRC instalada

IV.7. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE TECIDO

Após 30 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com a solução de cetamina e xilazina via intraperitoneal, como descrito anteriormente. Com os animais anestesiados, o sangue foi coletado através da punção da veia cava, com auxílio de uma seringa de 5 mL acoplada a uma agulha de 21G (KDL®, Guarulhos, Brasil).

Imediatamente após a coleta sanguínea, o rim esquerdo de cada animal foi extraído e seccionado, no eixo transversal, em três fragmentos coronais de aproximadamente 5mm, um dos quais, destinado à histologia e imunohistoquímica, foi fixado em solução de Duboscq-Brazil por 40 minutos e transferidos para uma solução de formol a 4% em tampão fosfato salino por 48 horas e então processado e emblocado, e os outros dois fragmentos foram, separadamente, congelados em nitrogênio líquido e destinados à extração de mRNA e proteína. Ao término dos procedimentos, os animais foram submetidos à eutanásia por meio da punção do ventrículo esquerdo com escalpe de 19G (KDL®, Guarulhos, Brasil). As amostras de sangue coletadas foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e armazenadas a 4° C por até 24h para as dosagens séricas.

IV.8. PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial sistólica foi aferida ao final do período de acompanhamento, por dois dias consecutivos, sendo que em cada dia a pressão foi registrada de 3 a 5 vezes. A média das pressões verificadas no último dia foi considerada a pressão arterial dos ratos em questão. Para tal medida, os ratos foram colocados em sala apropriada no período da manhã, e a pressão caudal foi aferida em equipamento acoplado a um transdutor de pressão (RTBP 2000 - Kent Scientific Corporation, Torrington, EUA), que fornece um sinal analógico. O sinal analógico foi digitalizado e registrado

utilizando-se um sistema de aquisição e análise dos dados com o programa DASyLab 7.0 (DASyTec, National Instruments Company, Amherst, EUA). As medidas foram realizadas com os animais acordados e foram consideradas apenas aquelas obtidas em condição de ausência de movimentação do animal.

IV.9. EXCREÇÃO URINÁRIA DE PROTEÍNA

Na véspera da eutanásia os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas por 24 horas para coleta de urina e registro do volume urinário.

Para a dosagem preliminar da proteinúria foi utilizada uma curva padrão com diluições crescentes de albumina sérica bovina (Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA): 0; 0,5mg/mL; 1,0mg/mL e 2,0mg/mL. Para cada tubo, foram adicionados 4,5 ml de ácido sulfossalicílico a 1% (Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA) e em seguida 0,5 ml do padrão, sendo que para as amostras, ao invés das soluções padrões adicionou-se 0,5 ml de urina. Os tubos foram agitados gentilmente para homogeneizar as amostras e a leitura da absorbância em 530nm foi realizada em um espectrofotômetro (Hitach U-2000, Japão). A concentração de proteína nas amostras de urina foi inferida a partir dos valores de absorbância plotados na curva padrão. A excreção urinária de proteínas em 24 horas foi obtida multiplicando-se a concentração de proteína medida pelo volume urinário observado.

IV.10. CREATININA SÉRICA

A dosagem da creatinina das amostras de soro foi feita através de um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, Brasil) baseado na reação de Jaffé-picrato alcalino. Resumidamente, a creatinina do soro reage com a solução de picrato em meio alcalino, formando, a 37° C, um complexo de cor amarelada que é medido fotometricamente a

510 nm. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina verdadeira, em mg/dL.

$$\text{Creatinina (não corrigida)} = \frac{A1-A2}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 4 \text{ mg/dL}$$

IV.11. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

IV.11.1. Processo de parafinização, corte e desparafinização do tecido renal

Após a coleta e a fixação do tecido renal, o material foi processado e parafinado automaticamente, a partir da desidratação em banhos sucessivos de álcoois com aumento progressivo de concentração (álcool 50%, álcool 70%, álcool 96% (2 banhos), álcool absoluto (2 banhos), seguido da diafanização em 1 banho de álcool absoluto + xilol e 3 banhos de xilol e finalmente pela imersão em parafina fundida a 60°C para a parafinização. O material parafinado foi incluído em blocos/moldes e permaneceu em temperatura ambiente.

Para a obtenção dos cortes do tecido, os blocos de parafina permaneceram 30 minutos a -20°C e, em seguida, foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) com navalhas descartáveis. Os fragmentos, com espessura de 3 a 4 µm, foram transferidos para lâminas previamente revestidas por silano 6% (Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA), que foram incubadas a 60°C por 2 horas para aderência do tecido, e em seguida foram armazenadas a 4°C.

Para a realização das colorações histológicas, a parafina foi removida dos fragmentos de tecido após as lâminas serem aquecidas a 60°C por 30 minutos e incubadas em xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 3 banhos de 9 minutos. Em seguida, as lâminas passaram por 2 banhos em etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) para remoção dos restos de xilol, e o tecido foi rehidratado em 2 banhos sucessivos em etanol 96%, 1 banho em etanol 70% e 1 banho em água destilada.

IV.11.2. Coloração de Ácido Periódico de Schiff para análise de glomeruloesclerose

As lâminas desparafinizadas foram lavadas em água destilada e incubadas em ácido periódico 1% durante 10 minutos e lavadas em seguida em água destilada. Em seguida, foram coradas pelo reativo de Schiff (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 45 minutos, em ambiente escuro, e lavadas em água corrente por 10 minutos. A contra coloração foi realizada com a hematoxilina de Harris por 5 minutos e, após serem lavadas em água corrente as lâminas foram montadas com lamínulas e meio permanente Permout (Fisher Chemical, Pittsburgh, EUA).

IV.11.3. Coloração de Tricômio de Masson para análise da fibrose intersticial

As lâminas desparafinizadas foram imersas em solução de hematoxilina de Harris por 1 minuto e 30 segundos, lavadas em água destilada, incubadas em solução Cromotrop (0,6g de Cromotrop 2R, 0,3 de Azul de Anilina, 0,8g de Ácido Fosfotungstico, 1ml de Ácido Acético Glacial e 99ml de água destilada) por 25 minutos e novamente lavadas em água destilada. As lâminas passaram então pelo processo de desidratação e diafanização e foram montadas com meio permanente Permout (Merck, Darmstadt, Alemanha).

IV.11.4. Análise histológica da glomeruloesclerose e da fibrose intersticial

A coloração do PAS foi utilizada para a avaliação dos índices de esclerose glomerular (GS) examinando-se sucessivamente um número nunca inferior a 250 glomérulos por lâmina. A frequência de cada categoria de lesão glomerular foi expressa como porcentagem total do número de glomérulos acometidos (GS%).

Para a avaliação do grau de expansão do interstício renal, o tecido corado pela técnica de Masson e foi submetido ao método de contagem de pontos. Para esta técnica, utiliza-se um sistema de microscópio acoplado a um monitor de vídeo com uma ocular graticulada de 176 pontos. Foram contados os pontos que correspondiam à área de expansão do interstício e da área tubular, analisando-se 25 campos consecutivos sob um aumento de 400x. A mesma forma de análise da fibrose foi utilizada para verificar a dilatação tubular. Os resultados são expressos em porcentagem da área de expansão do interstício (FI%) e dilatação tubular (DT%).

IV.12. IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a realização da técnica de imunohistoquímica, as lâminas foram desparafinizadas e rehidratadas como descrito anteriormente para histologia, e em seguida transferidas para solução salina tris-tamponada (TBS, 0,05M Tris e 0,9% cloreto de sódio pH 7,6). Na tabela 3, estão listados os anticorpos utilizados no presente projeto. O controle negativo do método foi realizado em todos os experimentos, omitindo-se os anticorpos primários específicos.

TABELA 3. Anticorpos utilizados na imunohistoquímica

ANTÍGENO	TIPO	DILUIÇÃO	ORIGEM
WT-1	Monoclonal camundongo	1:50	Dako, Carpinteria, EUA
Sinaptopodina	Monoclonal camundongo	1:800	Progen, Heidelberg, Alemanha
Miofibroblastos	Monoclonal camundongo	1:800	Sigma Chemical, Saint Louis, EUA
Macrófagos	Monoclonal camundongo	1:200	Serotec, Raleigh, EUA
Leucócitos	Monoclonal camundongo	1:100	Serotec, Raleigh, EUA

IV.12.1. Exposição de epítomos

Durante o processo de fixação pode ocorrer o “mascaramento” de antígenos no tecido, dificultando assim sua detecção. Para aumentar a exposição antigênica no tecido analisado, foi utilizada técnica do micro-ondas (para macrófago, leucócito, miofibroblasto), e a técnica da panela a vapor (para WT-1 e sinaptopodina). A recuperação de antígenos realizada em tampão citrato pH 6,0(ácido cítrico, 0,001M). No caso das lâminas que foram para o micro-ondas, foi utilizada a potência de 2400 watts durante 15 minutos, enquanto que para a técnica de panela a vapor as lâminas foram mantidas por 30 minutos à uma temperatura de aproximadamente 95° C. Ao término do processo, as lâminas foram resfriadas lentamente até atingir a temperatura ambiente, lavadas com água destilada para a retirada do tampão citrato, permanecendo posteriormente em TBS ou PBS.

IV.12.2. Identificação de macrófagos, leucócitos e miofibroblastos

Com o objetivo de bloquear as possíveis ligações inespecíficas do complexo biotina-streptavidina-fosfatase alcalina devidas à presença de biotina endógena no rim, o tecido foi incubado coberto com solução de avidina (Vector, Burlingame, EUA) por 15 minutos a temperatura ambiente, lavado com TBS por 5 minutos e, em seguida coberto com soma solução de biotina (Vector, Burlingame, EUA) por 15 minutos, e então lavado em TBS por 5 minutos.

Para prevenir a ocorrência de ligações inespecífica dos anticorpos utilizados com outras proteínas do tecido, o tecido incubado com *Protein Block Sotuion* (Spring Bioscience, Plessanton, EUA) por 30 minutos antes da adição dos anticorpos primários específicos mostrados na tabela 3.

A incubação com os anticorpos permaneceu por 12 horas, à 4° C em câmara úmida. Após lavagem com TBS para retirada do anticorpo não ligado, o tecido foi incubado por 30 minutos com *Universal Biotinilated Link* (DAKO, Carpinteria, EUA) contendo anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho biotinilados, e em seguida com o complexo *Streptavidin-Biotin-Alcalin Phosphatase* (DAKO, Carpinteria, EUA), por mais 30 minutos. O tecido foi incubado com solução substrato para fosfatase alcalina (0,54mM naftol fosfato e 2mM levamisole 0,1 M Tris pH 8,2) contendo o corante *FAST RED* a 0,001%.

As células positivas para os marcadores estudados apresentam cor avermelhada. O tempo de revelação para os diversos antígenos variou de 10 a 30 minutos e a contra coloração foi feita com hemalumbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha).

IV.12.3. Identificação de marcadores de podócitos

A presença dos marcadores de podócitos, por WT-1 e sinaptopoidina, foi estudada através da técnica de imunoperoxidase, utilizando o kit *NovoLink®* (Leica Novocastra, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido). Após a desparafinização e a recuperação de antígenos pela técnica da panela a vapor, as lâminas foram incubadas sucessivamente, por 5 minutos, com as soluções *Peroxidase Block Reagent* e *Protein Block Solution*, para o bloqueio da peroxidase endógena e dos antígenos inespecíficos presentes no tecido, respectivamente. Em seguida o material foi incubado com os anticorpos primários, nas concentrações descritas na tabela 3, em câmara úmida a 4°C por uma noite. Após lavagem para retirar o excesso de anticorpo, o tecido foi incubado por 30 minutos com a solução *Post Primary Block*, seguida por 30 minutos com o *NovoLink Polymer*. Todas as etapas foram intercaladas por 2 lavagens de 5 minutos em TBS, sob agitação.

Para a revelação as lâminas foram incubadas com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), diluído em *DAB Substrate Buffer*, por 5 minutos, quando as células positivas apresentaram cor marrom. O tecido foi contracorado com hemalumbre de Mayer e as lamínulas foram montadas com meio permanente Permount (Merck, Darmstadt, Alemanha).

IV.12.4. Análise da imunohistoquímica

Os resultados de imunohistoquímica foram avaliados visando identificar, localizar e quantificar as células marcadas nos sítios onde cada antígeno fosse predominante presente: glomérulos, interstícios e túbulos.

IV.12.4.a) Quantificação de macrófagos e leucócitos: Para a quantificação de macrófagos e linfócitos T, foi realizada a contagem do número de células positivas no córtex renal inteiro, sob o aumento microscópico de 200x. O resultado foi expresso como a média de células por mm².

IV.25.4.b) Quantificação de miofibroblastos: Para a avaliação do grau de expansão do interstício renal foi utilizado um sistema de microscópio acoplado a um monitor de vídeo com uma ocular graticulada de 176 pontos. Foram contados os pontos que correspondiam à área de expansão do interstício, analisando-se 25 campos consecutivos sob um aumento de 200x. Os resultados são expressos em porcentagem da área de expansão do interstício.

IV.12.4.c) Quantificação de WT-1 e sinaptopodina: Para a quantificação de WT-1 foram contados os núcleos positivos de 50 glomérulos/caso, sob o aumento microscópico de 400X. A média foi expressa em números de núcleos positivos por glomérulo. Para a quantificação de sinaptopodina foram fotografados 25 glomérulos de cada animal no aumento de 400x (Infinity Capture Imaging Software, Lumenera, Ottawa, Canada) e em seguida a porcentagem da área correspondente aos podócitos foi quantificada com o software Image ProPlus (Media Cybernetics, Bethesda, EUA).

IV.13. ANÁLISE DE CITOCINAS NO TECIDO

A quantificação das citocinas presentes no tecido foi realizada através do método multiplex/luminex com o kit MILLIPLEX® MAP (Millipore Corporation, Billerica, EUA). O painel Rat (cytokine/chemokine - immunoassay), contendo anticorpos para quantificar as citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, INF- γ ,

TNF- α , MCP-1 VEGF e RANTES. Todo ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo do fabricante e para tal, as proteínas teciduais foram extraídas previamente.

IV.13.1. Extração de proteína do tecido renal

Para a extração da proteína total do tecido, fragmentos de tecido renal foram macerados em homogeneizador de vidro, com tampão de lise *T-PER* (Thermo Scientific, Waltham, EUA) contendo inibidores de proteases e fosfatases (aprotinina 0,800 nM, leupeptina 20 μ M, bestatina 50 μ M, pepstatin A 10 μ M, E64 15 Mm, AEBSF 1mM, EDTA 5 Mm, fluoreto de sódio, ortovanadato de sódio, pirofosfato de sódio e beta-glicerofosfato), na proporção de 1,0 ml de tampão para 0,1 g de tecido. O homogenato obtido foi centrifugado a 10.000 x g, a 4° C por 5 minutos. O sobrenadante foi então coletado e a concentração total de proteína de cada amostra foi determinada em ensaio colorimétrico com reagente Pierce® 660 (Thermo Scientific, Waltham, EUA) utilizando como padrão albumina sérica bovina, segundo as instruções do fabricante. As amostras foram armazenadas em -80° C até o momento das dosagens.

IV.13.2. Reação MULTIPLEX

Para a dosagem das citocinas presentes nas amostras previamente preparadas, as placas contendo 96 poços tiveram seus filtros lavados com *Bioplex Wash Buffer*, e em seguida, foram adicionadas *beads* conjugadas com os anticorpos anti-citocinas e lavados com *Bioplex Wash Buffer*.

As amostras foram então adicionadas de acordo com o sugerido pelo fabricante, e permaneceram incubadas por 2 horas. As placas foram novamente lavadas com *Bioplex Wash Buffer*, e em seguida, foi adicionado em cada poço anticorpo biotilado para detecção da citocina por epítipo diferente daquele reconhecido pelo

anticorpo conjugado às beads. Após 1 hora de incubação novas lavagens foram realizadas com *Bioplex Wash Buffer*, terminando com a ressuspensão dos *beads* e análise pelo *Bioplex Suspension Array System/Luminex* (Bio-Rad) utilizando o *Software Bio-Plex Manager*, versão 4.0 (Bio-Rad).

IV.14. ANÁLISE GÊNICA TECIDUAL

IV.14.1. Extração de RNA total

RNA total foi extraído das amostras de córtex renal com o reagente Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante. Cada 0,1 g de tecido foi homogenizado com 1 mL de Trizol com auxílio de um dispersador de tecidos (IKA – Labortechnik Ultra Turrax T25 Janke & Kunkel, Staufen, Alemanha). A cada mL de homogenato, foram adicionados 200µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha), a mistura foi novamente homogeneizada e mantida por 3 minutos a temperatura ambiente.

Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 12.000xg, a 4° C por 15 minutos. A fase superior contendo RNA foi transferida para um microtubo de 2 mL contendo o mesmo volume de isopropanol gelado (Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA). As amostras foram centrifugadas a 12.000xg durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* contendo RNA foi ressuspendido em 1 mL de etanol 70% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e centrifugado novamente a 12.000xg por 10 minutos. Este procedimento foi repetido e o pellet foi ressuspendido com 50µL de água ultrapura (Invitrogen, Life Technologies, NY, EUA).

A quantidade de RNA obtido foi determinada através da leitura, em espectrofotômetro (*NanoDrop*, Thermo Fisher Scientific, Marietta, EUA), da

absorbância das amostras no comprimento de onda 260 nm, onde a absorbância de 1 OD corresponde a uma solução pura de RNA, em fita-simples, na concentração de 40 µg/mL. A absorbância das amostras a 280 nm também é determinada, para verificar a presença de proteínas. Valores da relação Abs_{260nm}/Abs_{280nm} entre 1,7 e 2,0 são considerados aceitáveis. As amostras de RNA total extraído foram mantidas a -80° C até a reação seguinte.

IV.14.2. Transcrição Reversa

Todos reagentes utilizados para a reação de síntese do DNA complementar (cDNA) foram da marca Promega (Promega, San Luis Obispo, EUA). Um microlitro de *oligo dT primer* (500 µg/ml) foi misturado a 14 µl da amostra de RNA previamente diluída a 50 ng/µl. A solução foi aquecida a 70°C por 5 minutos e resfriada em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 5 µl de tampão [5X] (Tris-HCl 250 mM pH=8,3, KCL 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2,75 µl de água ultrapura, 1,25 µl de dNTP Mix (10mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e 1 µl (200U) da enzima transcriptase reversa M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*). A reação foi realizada a 42°C por 50 minutos, passando posteriormente por um período de 15 minutos a 70°C para a inativação da enzima. O cDNA foi mantido em freezer a -20°C até a realização da reação de PCR em tempo real.

IV.14.3. RT-PCR Tempo Real

Primers para a obtenção de amplicons com no máximo 250 pb, foram confeccionados (representados na **tabela 4**). Para a PCR em tempo real foi utilizado o kit *SYBR GreenEr qPCR SuperMix Universal* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e todas as reações foram realizadas em duplicatas, no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, EUA)

Um microlitro de cDNA foi acrescido a 7,5 µL de mix do kit, 0,6 µL de *primer forward* (10 µM), 0,6 µL de *primer reverse* (10 µM), 5,75 µl de água deionizada e 0,15 µl de Rox. A mistura foi aquecida a 50°C por 10 minutos e depois a 95°C por 5 minutos, seguindo 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A curva de melting foi feita à 65°C com variação de 1°C.

A expressão gênica foi determinada como a expressão relativa entre o gene alvo e o gene *housekeeping* 18S, calculadas pelo *software* do aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), a partir dos *cycle threshold* (CT) das reações.

Para o cálculo dos resultados do PCR em tempo real foi utilizado o método ΔC_T , que utiliza as fórmulas:

$$\Delta C_T = C_T \text{ gene alvo} - C_T \text{ gene endógeno}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ do gene alvo} - \Delta C_T \text{ do gene endógeno}$$

A variação na taxa da expressão gênica foi calculada como $2^{-\Delta \Delta C_T}$ (Livak *et al.*, 2001)

Ou seja, após determinada a diferença na variação do CT entre o gene alvo e o gene constitutivo, os valores são normalizados pelo cálculo do seu logaritmo. O erro padrão foi calculado a partir dos valores normalizados de CT.

TABELA 4. Sequências dos *primers* utilizados para o PCR em tempo real

GENE ALVO	PRIMERS
18S	Sense 5' AGTCCCTGCCCTTTGTACACA 3'
	Antisense 5' GCCTCACTAAACCATCCAATCG 3'
WT-1	Sense 5'TCCTGGCTCCCCTGGAATCTGTGAA3'
	Antisense 5'CTGGAGGGCCTGGTGGACCAG3'
Sinaptopodina	Sense 5'TCCTGGCTCCCCTGGAATCTGTGAA3'
	Antisense 5'CTGGAGGGCCTGGTGGACCAG3'
Colágeno tipo I	Sense 5'CACCTCCGGACGGAGCAGGA3'
	Antisense 5'CTCTTTCGCGCTGGGGTGGG3'
Fibronectina	Sense 5'TGACCCAGACTTACGGTGGCA3'
	Antisense 5'GGAGTAGAAGGTCCTACCGTTGTAGTG3'
IL-1β	Sense 5'CCTTGTGCAAGTGTCTGAAGCAGC 3'
	Antisense 5'GCCACAGCTTCTCCACAGCCA 3'
TNF-α	Sense 5'TGGCCCAGACCCTCACACTCA3'
	Antisense 5'GGCTCAGCCACTCCAGCTGC3'
IL-2	Sense 5' GCAGCTCGCATCCTGTGTT 3'
	Antisense 5' TGGGTGCGCTGTTGACAA 3'
IFN-γ	Sense 5' TCTGGAGGAACTGGCAAAAGG 3'
	Antisense 5' TCAAGACTTCAAAGAGTCTGAG 3'
IL-6	Sense 5' CCGGAGAGGAGACTTCACAGAGGA 3'
	Antisense 5'AGCCTCCGACTTGTGAAGTGGTATA 3'
IL-4	Sense 5 TGGGTCTCAGCCCCACCTT' 3'
	Antisense 5' TCCGTGGATACCGTTCCCGGT 3'
IL-10	Sense 5'TCAGTCACATTTGTTTTCTGCAAA 3'
	Antisense 5' CTGCAAAAGTGGAGCAGTCATT 3'

IV.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ SEM (erro médio padrão). A análise estatística foi baseada na comparação de grupos utilizando-se, para os cálculos o *software GraphPad Prism* versão 6.01 (Graphpad Software, La Jolla, EUA). As diversas variáveis foram testadas para normalidade e em caso positivo foi aplicado o teste *one way* ANOVA, com pós-teste de Kruskal-Wallis na presença de diferença estatística.

A análise estatística foi feita inicialmente entre as variáveis 15d, 30d e 60d de cada grupo experimental agrupado, como Sham, Nx e Nx+CTmLA, e os três grupos pertencentes a cada categoria foram comparados entre si. Num segundo momento, os grupos experimentais foram comparados de acordo com os tempos de acompanhamentos 15d, 30d e 60d. Foram considerados estatisticamente significativos quando o valor p foi menor que 0,05.

V. RESULTADOS

V.1. ISOLAMENTO DE CTmLA DE AMOSTRAS DE AMNIOCENTESE

A padronização do cultivo das CTmLA foi realizada utilizando-se a técnica de aderência ao plástico, a partir de 5 amostras de LA de pacientes entre 12 e 18 semanas de gestação. Foram desconsideradas possíveis presenças de hemácias, leucócitos e células epiteliais durante a contagem celular.

Após 24 horas de cultivo, as células aderidas ao plástico apresentaram morfologia fibroblastóide e, após 5 dias de cultivo, observou-se uma diminuição no número de células aderidas, devido ao desprendimento dos tipos celulares não fibroblastóides, como células epiteliais. Com 10 dias de cultivo, as células apresentaram uma alta atividade proliferativa e formação de colônias e, com 15 dias de cultivo, a confluência nas garrafas foi de aproximadamente 80%. Para cada 20 mL de LA, houve a formação de aproximadamente 150 colônias celulares (Figura 4). Após a primeira tripsinização, foram obtidas aproximadamente 1 milhão (1×10^6) de células e nas demais passagens, cerca de 1 bilhão (1×10^9) de células, com viabilidade de 95%.

FIGURA 4. Imagem representativa das células isoladas com formato fibroblastóide (*fibroblast-like colonies*), crescendo em colônias após coloração com Giemsa. A) visão macroscópica das colônias de células; B) Visão microscópica de uma colônia celular (100x); C) Imagem representativa das células com característica fusiforme durante o cultivo celular (400x)

V.2. DIFERENCIAÇÃO CELULAR DAS CTmLA

V.2.1. Linhagem osteogênica

Sob a ação dos estímulos específicos e condições apropriadas, as CTmLA primárias foram capazes de se diferenciar em osteoblastos. Acúmulo de cálcio foi visualizado utilizando-se a coloração Vermelho de Alizarina. A presença da enzima fosfatase alcalina foi evidenciada com a coloração de fosfatase alcalina (Figura 5).

FIGURA 5. Diferenciação das CTmLA em células da linhagem osteogênica. A) Células indiferenciadas não apresentaram nenhuma coloração; B) Coloração vermelha de alizarina para visualização de cálcio; C) Coloração resultante da atividade da fosfatase alcalina, produzida pelas células

V.2.2. Linhagem adipogênica

Sob a ação dos estímulos específicos e condições apropriadas, as CTmLA primárias se diferenciaram em adipócitos, o que foi comprovado pelos depósitos de lípidos no citoplasma, identificados sob a coloração de Oil Red-O (Figura 6).

FIGURA 6. Caracterização da diferenciação adipogênica das CTm derivadas de LA. A) Células indiferenciadas não apresentaram nenhuma coloração; B e C) Vacúolos lipídicos presentes após a coloração de Oil-Red

V.2.3. Linhagem condrogênica

Após a utilização de estímulos específicos e mantidas em condições apropriadas, as CTmLA primárias foram capazes de se diferenciar em condroblastos. A presença de matriz extracelular de condroblastos, formado por colágeno tipo II, conderina, decorina e fibromodulina foi detectada através da coloração *Alcian Blue* (Figura 7).

FIGURA 7. Caracterização da diferenciação condrogênica. A) Células indiferenciadas não apresentaram nenhuma coloração B) Presença de matriz extracelular detectada após a Coloração por Alcian Blue

V.3. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL POPULACIONAL DAS CTmLA POR CITOMETRIA DE FLUXO

A população celular mantida em cultura expressou, em alta intensidade, os antígenos de superfície CD29, CD44, CD90 e CD105 (90%, 80%, 95% e 93% da população total, respectivamente). Por outro lado, a expressão dos marcadores CD14, CD31, CD34, CD45, CD86 e CD117 foram de baixa intensidade (apenas 1%, 1%, 11%, 2%, 1% e 8% da população, respectivamente). Os resultados demonstraram que a população celular apresentava o padrão de imunofenotipagem característica das CTmLA. A imunofenotipagem está representada abaixo na forma de histograma (Figura 8).

FIGURA 8. Caracterização de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo. CTm foram positivas para CD29, CD44, CD90 e CD105 e negativas para CD14, CD31, CD34, CD45, CD86 e CD117

V.4. ESTABELECIMENTO DO MODELO DE DRC

O estabelecimento da DRC após 15 dias da realização da nefrectomia 5/6 foi confirmado pela análise dos parâmetros clínico-laboratoriais, sendo constatado aumento da pressão arterial, dos níveis de proteinúria, da creatinina sérica e dos índices de glomeruloesclerose e de fibrose intersticial (Tabela 5). Além disso, foi observado redução dos marcadores podocitários WT-1 e sinaptopodina (Tabela 6).

Estes resultados mostram que a administração de CTmLA foi realizada no momento da lesão renal já estabelecida.

V.5. EFEITO DE 1 OU 2 DOSES DE CTmLA EM DRC INSTALADA

A Tabela 5 mostra os resultados dos protocolos experimentais dos ratos Wistar machos que receberam inoculação de 1 ou 2 doses de CTmLA humanas após 15 dias da nefrectomia 5/6 e que foram acompanhados até completarem 30 e 60 dias após a cirurgia.

TABELA 5. Resultados dos parâmetros clínico-laboratoriais e histológicos dos animais que receberam CTmLA após 15 dias da indução da lesão renal e que foram submetidos a eutanásia após 30 dias e 60 dias de experimento

			PA (mm Hg)	U _{prot} (mg/24 h)	S _{creat} (mg/dL)	GS (%)	FI (%)
1 dose	Sham	15d	132±2	12±1	0,4±0,1	0±0	0,3±0
	Nx	15d	160±3 ^a	33±5 ^a	0,9±0,5 ^a	11±2 ^a	1,3±0 ^a
	Sham	30d	131±2	10±1	0,5±0,5	0±0	0,3±0
	Sham+CTmLA	30d	146±3	17±3	0,5±0,5	0±0	0,5±0
	Nx	30d	183±3 ^{b,d}	86±8 ^{b,d}	1,0±0,1 ^b	24±3 ^{b,d}	3,0±0 ^{b,d}
	Nx+CTmLA	30d	169±4 ^{b,e}	43±7 ^{b,e}	0,8±0,1 ^b	5±1 ^e	3,0±0 ^b
	Sham	60d	137±6	11±2	0,6±0,0	0±0	0,5±0
	Nx	60d	185±5 ^{c,d}	116±16 ^{c,d}	1,2±0,2 ^c	27±5 ^{c,d}	5,6±1 ^{c,d,e}
	Nx+CTmLA	60d	177±2 ^c	64±13 ^{c,f}	1,1±0,2 ^c	9±4 ^f	5,3±1 ^{c,e,g}
	Sham	60d	143±6	8±2	0,8±0,0	0±0	1,0±0
2 doses	Nx	60d	184±12	120±19	1,2±0,1	28±4	5,6±0
	Nx+CTmLA	60d	149±7 ^{f,g,h}	49±12 ^{c,f}	1,0±0,1 ^c	14±5 ^c	2,6±0 ^{c,f,h}

PA: pressão caudal

U_{prot}: proteinúria

S_{creat}: creatinina sérica

GS: glomeruloesclerose

FI: fibrose intersticial

p<0,05 vs

^a Sham15d

^b Sham30d

^c Sham60d

^d Nx15d

^e Nx30d

^g x+CTmLA30d

^h Nx+CTmLA60d

V.5.1. Localização das células inoculadas no tecido renal

A localização das CTmLA no tecido renal de ratos Wistar, das células inoculadas na região subcapsular renal foi identificada por meio da localização dos cromossomo X e Y humanos. A análise mostrou que 15 dias após a inoculação de CTmLA na região subcapsular renal, as células estão localizadas principalmente nos glomérulos e na área intersticial. As células foram identificadas como XX, pois o sinal encontrado foi para o par do cromossomo X. As imagens estão representadas abaixo na Figura 9.

FIGURA 9. Localização da CTmLA no tecido renal. A, B e C) animais Nx 30 dias que receberam CTmLA humanas diretamente no tecido renal

V.5.2. Pressão Arterial

Como esperado, a pressão arterial dos animais do grupo Sham (15d, 30d e 60d) se mostrou normal e não apresentou variação ao longo do tempo. No grupo Nx, houve aumento significativo da pressão arterial nos animais 15d, 30d e 60d, caracterizando o estabelecimento da DRC.

A inoculação de 1 dose de CTmLA preveniu significativamente o aumento da pressão arterial nos animais Nx30 dias (grupo Nx+CTmLA30d). Aos 60 dias, o tratamento com 1 dose de CTmLA (grupo Nx+CTmLA60d) não mostrou diferença significativa com o grupo Nx60d. No entanto, o tratamento com 2 doses de CT, avaliado após 60 dias, mostrou diminuição significativa dos níveis pressóricos em comparação ao grupo Nx60d, chegando a níveis semelhantes aos do grupo controle Sham60d.

Na comparação entre os grupos de animais que receberam CTmLA, os animais que receberam 2 doses de CTmLA (60d) apresentaram redução significativa dos níveis de pressão arterial, em relação aos que receberam apenas 1 dose (30d e 60d).

FIGURA 10. Pressão caudal nos diferentes grupos

V.5.3. Proteinúria

Não houve variação nos níveis de proteinúria nos animais Sham (15d, 30d e 60d). No grupo Nx, ao longo do período estudado, houve aumento marcante na proteinúria em comparação ao grupo controle, alcançando níveis significativamente mais elevados aos 60dias comparados aos 15 e 30 dias. Nos animais Nx que receberam CTmLA houve redução de cerca de 50% dos níveis de proteinúria ($p<0,05$). Não houve diferença estatisticamente significante dos níveis de proteinúria entre os animais Nx que receberam 1 ou 2 doses de CTmLA.

FIGURA 11. Proteinúria nos animais dos diferentes grupos

V.5.4. Creatinina sérica

No grupo Nx houve aumento da creatinina sérica, confirmando o estabelecimento da DRC. O tratamento com CTmLA não diminuiu os níveis séricos de creatinina quando comparado com os animais Nx. Entre os animais que receberam CTmLA, 1 dose ou 2 doses, não foram encontradas diferenças significativas.

FIGURA 12. Creatinina sérica nos animais dos diferentes grupos

V.5.5. Glomeruloesclerose

A análise histológica mostrou que os animais do grupo Nx apresentaram um aumento do índice de glomerulos esclerosados, comparado com os animais do grupo Sham. A figura abaixo ilustra cortes histológicos com avaliação da glomeruloesclerose dos grupos 30 dias (400x).

O tratamento com dose única de CTmLA nos animais com Nx promoveu uma redução marcante da glomeruloesclerose, observada após 30 e 60 dias de acompanhamento ($p<0,05$). A administração de 2 doses de CT também protegeu contra o desenvolvimento da glomeruloesclerose, porém não foi mais eficaz do que o tratamento com dose única.

FIGURA 13. Porcentagem de glomeruloesclerose nos diferentes grupos.

TABELA 6. Resultados da imunohistoquímica para identificar podócitos (através da detecção de WT-1 e sinaptopodina) nos diferentes grupos

			WT-1 (n° nucl/glom)	Sinaptopodina (% área cheia)
	Sham	15d	11±0	35±4
	Nx	15d	6±0 ^a	12±1 ^a
1 dose	Sham	30d	11±0	47±4
	Sham+CTmLA	30d	11±0	36±3
	Nx	30d	6±0 ^b	12±1 ^b
	Nx+CTmLA	30d	9±0 ^e	26±2 ^{b,e}
	Sham	60d	10±1	49±10
	Nx	60d	6±0 ^c	10±3 ^c
	Nx+CTmLA	60d	9±0 ^f	30±5 ^c
2 doses	Sham	60d	10±0	38±7
	Nx	60d	5±0	7±1
	Nx+CTmLA	60d	7±0 ^c	23±5 ^c

p<0,05 *versus*

^a Sham15d

^b Sham30d

^c Sham60d

^d Nx15d

^e Nx30d

^f Nx60d

^g Nx+CTmLA30d

^h Nx+CTmLA60d (1dose)

V.5.6. Marcador podocitário WT-1

Com o objetivo de estudar a lesão glomerular de forma mais criteriosa, foi investigada a expressão de WT-1, um marcador específico de podócitos.

Experimentos realizados utilizando-se PCR em tempo real, para determinar a expressão de WT-1 em nível de mRNA em amostras de tecido renal, revelaram uma expressão significativamente menor de WT-1 nos animais Nx30d comparados aos animais Sham ($0,2 \pm 0,4$ *versus* $1,0 \pm 0,6$, respectivamente; $p < 0,05$). O tratamento com CTmLA recuperou, de forma significativa, a expressão deste marcador podocitário ($1,0 \pm 0,2$).

FIGURA 14. Expressão gênica de WT-1, por PCR em tempo real, nos diferentes grupos

Experimentos de imunohistoquímica localizaram a expressão de WT-1, em nível proteico, nos glomérulos, mais especificamente, no núcleo dos podócitos (fotomicrografias abaixo, aumento 400x). Houve uma perda significativa da expressão de WT-1 nos animais Nx. O tratamento com 1 dose de CTmLA foi efetivo em aumentar significativamente a expressão de WT-1, indicando restabelecimento da população de podócitos, sendo este restabelecimento mantido após 60 dias. A inoculação da 2ª dose de CTmLA não teve efeito adicional na expressão de WT-1.

FIGURA 15. Expressão de WT-1 nos diferentes grupos

V.5.7. Marcador podocitário sinaptopodina

A expressão de sinaptopodina, um marcador específico do citoesqueleto de podócitos, também foi analisado.

Experimentos realizados utilizando-se PCR em tempo real, para determinar a expressão de sinaptopodina em nível de mRNA em amostras de tecido renal, revelaram uma expressão significativamente menor de sinaptopodina nos animais Nx30d comparados aos animais Sham ($0,6 \pm 0,3$ versus $1,0 \pm 0,2$, respectivamente; $p < 0,05$). O tratamento com CTmLA recuperou de forma significativa a expressão deste marcador podocitário ($2,0 \pm 0,2$).

FIGURA 16. Expressão gênica da sinaptopodina, por PCR em tempo real, nos diferentes grupos

Experimentos de imunohistoquímica localizaram a expressão de sinaptopodina, nos glomérulos, (fotomicrografias abaixo, aumento 200x). Nos ratos normais (Sham), a expressão de sinaptopodina foi detectada nos glomérulos. Nos animais Nx, houve redução significativa da expressão deste marcador. O tratamento com CTmLA restabeleceu de forma significativa a expressão glomerular de sinaptopodina após 30 dias, mantida após 60 dias. Não houve diferença com a administração de 1 ou 2 doses de CTmLA.

FIGURA 17. Expressão de sinaptopodina nos diferentes grupos experimentais

V.5.8. Fibrose Intersticial

Os animais submetidos ao modelo Nx evoluíram com comprometimento do compartimento túbulo-intersticial, caracterizado por marcante fibrose intersticial (ilustrações abaixo, aumento 200x).

Quinze dias após a indução do modelo (Nx15d), os animais já apresentaram índices de fibrose intersticial significativamente mais acentuados do que os animais Sham15d. Ao longo do tempo estudado, a fibrose intersticial agravou-se progressivamente (no grupo Nx30d e Nx60d). O tratamento com 1 dose de CTmLA não foi eficaz para bloquear a fibrose intersticial. Entretanto, os animais que receberam 2 doses de CTmLA apresentaram diminuição significativa dos índices de fibrose intersticial, comparados aos Nx60d.

FIGURA 18. Porcentagem de fibrose intersticial nos diferentes grupos

V.5.9. Colágeno tipo I

A expressão de colágeno tipo I, um componente da matriz extracelular, foi analisada neste estudo.

Experimentos realizados utilizando-se PCR em tempo real para determinar a expressão de colágeno tipo I em nível de mRNA em amostras do córtex renal, revelaram uma expressão significativamente maior de colágeno tipo I nos animais Nx30d comparados aos animais Sham ($2,4 \pm 0,3$ versus $1,0 \pm 0,5$, respectivamente; $p < 0,05$). O tratamento com CTmLA aumentou de forma significativa ainda mais a expressão deste marcador de fibrose ($4,4 \pm 0,4$).

FIGURA 19. Expressão gênica de colágeno tipo I, por PCR em tempo real, nos diferentes grupos.

V.5.10. Fibronectina

A expansão intersticial renal também foi investigada por PCR em tempo real para determinar o nível de expressão da fibronectina, outro componente da matriz extracelular.

A expressão de fibronectina aumentou nos animais Nx30d comparados aos animais Sham ($2,0 \pm 0,4$ versus $1,0 \pm 0,5$, respectivamente; *ns*). O tratamento com CTmLA aumentou, de forma significativa, a expressão deste marcador de fibrose ($3,3 \pm 0,5$; $p < 0,05$ vs Sham).

FIGURA 20. Expressão gênica do fibronectina, por PCR em tempo real, nos diferentes grupos.

TABELA 7. Resultados da imunohistoquímica para miofibroblastos (α -SMA), macrófagos (CD68) e leucócitos (CD43) nos diferentes grupos

			Miofibroblastos (%)	Macrófagos (cels/mm ²)	Leucócitos (cels/mm ²)
	Sham	15d	1±0	14±2	13±1
	Nx	15d	5±1 ^a	41±10 ^a	22±3
1 dose	Sham	30d	0±0	12±2	15±2
	Sham+CTmLA	30d	0±0	6±2	16±2
	Nx	30d	10±1 ^{b,d}	51±5 ^b	32±3 ^b
	Nx+CTmLA	30d	3±1 ^{b,e}	16±4 ^e	22±2 ^e
	Sham	60d	1±0	3±2	23±5
	Nx	60d	11±1 ^{c,d}	60±10 ^c	57±6 ^{c,d,e}
	Nx+CTmLA	60d	5±2 ^{c,f}	10±4 ^f	57±2 ^{c,g}
2 doses	Sham	60d	-	3±1	24±2
	Nx	60d	-	55±11	43±3
	Nx+CTmLA	60d	-	52±9 ^{c,g,h}	34±10 ^h

p<0,05 versus

^a Sham15d

^b Sham30d

^c Sham60d

^d Nx15d

^e Nx30d

^f Nx60d

^g Nx+CTmLA30d

^h Nx+CTmLA60d (1dose)

V.5.11. α -SMA (Miofibroblastos)

A expressão de α -SMA mostrou-se constitutiva em células da musculatura lisa vascular do tecido renal, a qual não foi contabilizada na presente análise. O aumento significativo da expressão intersticial de α -SMA nos animais do grupo Nx indica a presença de miofibroblastos no interstício renal (ilustrações abaixo, aumento 200x). O tratamento com 1 dose de CTmLA promoveu a redução deste parâmetro de forma significativa aos 30 dias e 60 dias.

FIGURA 21. Resultados da expressão de α -SMA no tecido renal dos diferentes grupos, refletindo o número de miofibroblastos intersticiais

V.5.12. Macrófagos (CD68⁺)

Macrófagos foram identificados em todos os compartimentos renais, porém, de forma mais expressiva, no interstício renal. Os animais Nx apresentaram aumento gradativo do infiltrado do número de macrófagos no interstício renal. O tratamento com uma dose de CTmLA reduziu significativamente o número de macrófagos, aos 30 e 60 dias. Nos animais Nx que receberam 2 doses de CTmLA, o infiltrado de macrófagos foi elevado, semelhante ao do grupo Nx (ilustrações abaixo, aumento 200x).

FIGURA 22. Resultados da média do número de macrófagos no interstício renal nos diferentes grupos

V.5.13. Leucócitos (CD43⁺)

Leucócitos foram localizados infiltrando o interstício renal dos animais de todos os grupos experimentais. No entanto, os animais submetidos à nefrectomia 5/6 apresentaram aumento gradativo do número de leucócitos ao longo do período estudado (ilustrações abaixo, aumento 200x). O tratamento com 1 dose de CTmLA reduziu o número de leucócitos aos 30 dias, mas após 60 dias de seguimento o infiltrado foi restabelecido. O infiltrado leucocitário nos animais que receberam 2 doses de CTmLA, foi observada uma tendência à redução.

FIGURA 23. Média do número de leucócitos CD43⁺ no interstício renal dos diferentes animais dos diferentes grupos

V.5.14. MCP-1 e RANTES

Para avançar no estudo dos mecanismos celulares envolvidos na inflamação renal dos animais com DRC tratados com CTmLA após 30 dias de experimento, foi realizado o ensaio multiplex/luminex® xMAP® para dosar as concentrações dos mediadores MCP-1 e RANTES. Houve aumento nas concentrações de ambos os marcadores no córtex renal dos animais Nx após 30 dias, sendo que as concentrações, em valores absolutos, de RANTES foram maiores que as de MCP-1. A administração de CTmLA nos animais resultou em diminuição significativa das concentrações destes marcadores (Tabela 9 e Figura 21).

TABELA 8. Concentração das quimiocinas MCP-1 e RANTES quantificadas por multiplex no tecido renal dos animais 30 dias após cirurgia

	MCP-1 (pg/mL)	RANTES (pg/mL)
Sham	10±2	330±85
Nx	36±5*	1092±217*
Nx+CTmLA	17±4± [#]	415±44 [#]

FIGURA 24. Concentração dos marcadores MCP1 e RANTES no tecido renal dos animais dos grupos estudados

TABELA 9 Resultados da expressão gênica (PCR-tempo real) e proteica (multiplex) das citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido renal dos animais após 30 dias de experimento

	EXPRESSÃO GÊNICA (expressão relativa/18S)			EXPRESSÃO PROTEICA (pg/mL)		
	Sham	Nx	Nx+CTmLA	Sham	Nx	Nx+CTmLA
IL-1β	1,0 $\pm$ 6	1,2 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,3	50 $\pm$ 5	103 $\pm$ 8*	76 $\pm$ 8 [#]
TNF-α	1,0 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,4	3 $\pm$ 0	5 $\pm$ 0*	3 $\pm$ 0 [#]
IL-6	1,0 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,4	380 $\pm$ 41	461 $\pm$ 61	328 $\pm$ 39
IL-2	1,0 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,4	19 $\pm$ 3	27 $\pm$ 3	20 $\pm$ 2
INF-γ	1,0 $\pm$ 0,7	3,5 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,4	36 $\pm$ 5	67 $\pm$ 13	37 $\pm$ 5
IL-4	1,0 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,5	16 $\pm$ 1	24 $\pm$ 4	20 $\pm$ 3
IL-10	1,0 $\pm$ 0,6	0,8 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 0,5	14 $\pm$ 2	20 $\pm$ 3	16 $\pm$ 2

* p<0,05 vs Sham

p<0,05 vs Nx

V.5.15. Citocinas pró-inflamatórias no tecido renal

Para estudar os mecanismos moleculares envolvidos no microambiente renal dos animais com DRC tratados com CTmLA, foram realizados ensaios de PCR em tempo real e de multiplex/luminex®, avaliando as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6.

Experimentos realizados utilizando-se PCR em tempo real para determinar a expressão das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 revelaram valores semelhantes entre os grupos Sham30d e Nx30d. O tratamento com CTmLA aumentou estas citocinas em relação aos animais Nx, porém não significativo (Tabela 7 e Figura 25).

Com relação à análise por multiplex/luminex®, um aumento significativo nas concentrações de IL-1 β e TNF- α foi observado nos animais Nx após 30 dias quando comparados aos animais Sham 30 dias. A administração de CTmLA em Nx resultou em diminuição significativa das concentrações destas proteínas (Tabela 7 e Figura 25).

FIGURA 25. Expressão gênica e concentração proteica de IL-1 β , TNF- α e IL-6 no tecido renal dos animais dos grupos 30 dias

V.5.16. Citocinas Th1 e Th2 no tecido renal

Experimentos de PCR em tempo real para avaliar a expressão das citocinas IL-2, INF- γ , IL-10 e IL-4 em amostras do córtex renal dos animais dos diferentes grupos estudados não revelaram diferenças entre os animais dos grupos controle e Nx. O tratamento com CTmLA promoveu aumento da expressão de IL-4 ($p < 0,05$ vs Nx) e uma tendência de aumento da expressão de IL-10 (*ns* vs Nx) (Tabela 7 e Figura 26).

A quantificação destas citocinas no córtex renal dos animais dos mesmos grupos experimentais em experimentos de multiplex/luminex, não mostrou diferença estatística entre os grupos. Entretanto, houve uma tendência de aumento na concentração de INF- γ nos animais Nx e de diminuição nos animais tratados com CTmLA (Tabela 7 e Figura 26).

FIGURA 26. Expressão gênica e concentração proteica de IL-2, INF-γ, IL-4 e IL-10 no tecido renal dos animais dos grupos 30 dias

VI. DISCUSSÃO

CTm possuem potencial terapêutico para diferentes doenças devido à sua capacidade de modulação do microambiente da lesão, favorecendo a regeneração tecidual e a recuperação funcional. Este importante aspecto vem motivando o estudo de CT como possível terapia em diferentes modelos experimentais de lesão renal.

Em estudo anterior do nosso laboratório, foi analisado o efeito de CTm derivadas de MO no modelo de DRC, com resultados animadores, mostrando que a terapia com CT tem efeitos renoprotetores. No presente estudo, optou-se pelo uso de CTm derivadas de outra fonte, no caso, do LA. Esta importante fonte de CT foi investigada pela fácil obtenção deste material, considerando-se que amniocenteses são realizadas de rotina e que, após cariotipagem, este rico material é descartado. Além disso, as características das CTmLA, que têm alta taxa de proliferação *in vitro*, características de CTe e de CTm, tornam estas CT atraentes para possíveis usos terapêuticos.

O presente estudo teve também como objetivo principal analisar o possível efeito renoprotetor da inoculação de CTmLA em modelo de nefrectomia 5/6 com lesão já instalada, visando a possibilidade de ser considerada uma alternativa para o tratamento das doenças renais. Esta estratégia objetivou mimetizar a situação encontrada na prática clínica, na qual os pacientes com DRC são diagnosticados com a doença já instalada e muitas vezes em estágio avançado. Um dos modelos experimentais que melhor reproduz os achados clínicos dos pacientes com DRC é o modelo Nx 5/6, por seu caráter progressivo. Este modelo consiste na redução de 5/6 da massa renal,

levando ao desenvolvimento de hipertensão arterial, proteinúria e glomeruloesclerose, além de inflamação e fibrose intersticial.

O isolamento das CTmLA foi realizado primeiramente pela sua capacidade de aderência à superfície plástica e, em seguida, foram realizados experimentos para confirmar o perfil da população celular isolada. Como não existe um marcador específico para definir a população de CTm, foi necessário fazer o uso combinado de critérios de inclusão e exclusão. As células isoladas expressaram intensamente os marcadores CD29, CD44, CD90 e CD105 e fracamente os marcadores CD14, CD31, CD34, CD45 e CD117. As células isoladas confirmaram sua plasticidade através de ensaios de diferenciação *in vitro*, nas linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas. Estes resultados confirmaram o perfil de CTm e estão em concordância com diversos trabalhos publicados anteriormente (Pittenger *et al.*, 1999; De Coppi *et al.*, 2007; Mias *et. al.*, 2008; Sun *et. al.*, 2008; Noronha *et al.*, 2011; Janz *et al.*, 2012).

Embora a técnica de isolamento de CTmLA utilizada seja relativamente simples de ser executada, a obtenção de populações quase puras de CTmLA consumiu um tempo prolongado, de semanas a meses em cultura. A caracterização da população celular foi realizada a cada passagem e, em alguns casos, as células obtidas de determinadas pacientes precisaram ser descartadas após algumas passagens por não atingirem os critérios mínimos estipulados.

Tanto a via de inoculação quanto o número de CT a ser administrado parecem ser fundamentais para que as células desempenhem seu efeito protetor. A via de inoculação endovenosa não parece ser a alternativa mais apropriada para prover CT em número expressivo no órgão alvo (“*homing*”) (Poulsom *et al.*, 2001). No presente estudo, a inoculação de CTmLA sob a cápsula renal foi escolhida com o objetivo de

maximizar a presença destas células no local da injúria, facilitando uma interação mais duradoura com o órgão alvo, bem como evitar a dispersão que ocorre para outros órgãos quando a inoculação é feita por via endovenosa. Em 2009, nosso grupo documentou que CTm derivadas da MO, inoculadas na região subcapsular renal, foram localizadas no parênquima renal 5 dias após e ainda detectadas após 30 dias. Os resultados mostraram que houve migração e distribuição das células a partir da região subcapsular em direção à região cortical e medular. Analisando a migração celular ao longo do tempo, verificou-se que após 5 dias, as CT se encontravam na região subcapsular e também na região cortical, infiltrando nos glomérulos. Após 15 dias da inoculação, as CT foram localizadas principalmente no compartimento túbulo-intersticial. Trinta dias após a inoculação, fluorescência positiva ainda foi detectada no parênquima renal (Cavaglieri *et al.*, 2009). No presente estudo, foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* para detectar a presença dos cromossomos X e Y humanos nos ratos que receberam CTmLA. Após 15 dias de administração, estas células foram localizadas nos diferentes compartimentos da região cortical (glomérulos, túbulos e interstício).

Em estudo comparativo de vias de inoculação, Kinomura e colaboradores, em modelo de injúria renal aguda, injetaram células progenitoras endoteliais de ratos tanto via intra-arterial como subcapsular renal. Eles observaram que a inoculação subcapsular resultou em uma melhora significativa do escore de apoptose na lesão renal em comparação ao grupo que recebeu as CT por via intra-arterial. Concluíram que a inoculação diretamente no tecido pode ser mais benéfica comparada à infundida no fluxo sanguíneo (Kinomura *et al.*, 2008).

Os achados referentes à pressão arterial após a inoculação de CTmLA são de grande interesse, pois uma das principais características do modelo nefrectomia 5/6 é o

desenvolvimento de hipertensão severa. Os animais que receberam 1 dose de CTmLA tiveram diminuição da pressão arterial na análise aos 30 dias, mas este efeito não foi verificado após 60 dias. Surpreendentemente, a inoculação da segunda dose de CTmLA resultou na manutenção de níveis pressóricos em níveis mais baixos em 60 dias. Os mecanismos envolvidos nesta melhora hemodinâmica não estão claros.

Em estudos anteriores realizados no nosso laboratório, este efeito surpreendente de diminuição dos níveis da pressão arterial foi observado nos animais tratados com CT derivadas de MO. Em modelo de hipertensão renovascular, Oliveira-Salles e colaboradores constataram que o tratamento com CTm reduziu os níveis pressóricos, melhorou a função renal e também foi benéfico para o rim contralateral, o que proporcionou uma melhora morfológica e a preservação da capacidade de excreção de sódio. (Oliveira-Salles *et al.*, 2016) No presente estudo, a administração de CTmLA com a doença já instalada mostrou uma diminuição da pressão arterial na análise aos 30 dias, mas que não se manteve após 60 dias. A administração de uma segunda dose de CTmLA resultou na diminuição dos níveis pressóricos após 60 dias, chegando a níveis semelhantes aos do grupo controle. Os mecanismos envolvidos nesta melhora hemodinâmica não estão claros. Uma explicação para estes resultados seria um possível efeito hemodinâmico das CTm influenciando o balanço entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores, não investigados no presente estudo. Além disso, as CTm parecem atuar diretamente na resposta dos podócitos à angiotensina II. Em trabalho avaliando o efeito das CT em modelo de DRC, Sedrakyan e colaboradores mostraram que podócitos cultivados *in vitro* e estimulados com angiotensina II expressam altos níveis do receptor ANGTR1, um importante componente da via de sinalização da angiotensina. Quando CTmLA foram adicionadas à cultura de podócitos ativados,

houve diminuição da expressão de ANGTR1, similar ao verificado pelo losartan, uma droga antagonista dos receptores de angiotensina II (Sedrakyan *et al.*, 2012).

A proteinúria é um dos principais marcadores de doença renal e de prognóstico da progressão da DRC. A melhora dos níveis de proteinúria em modelos experimentais que receberam tratamento preventivo com CT derivadas de MO foi descrita em ablação 5/6 (Cavaglieri *et al.*, 2009), em modelo de rejeição crônica do enxerto renal (Franquesa *et al.*, 2012) e no modelo de hipertensão renovascular (Oliveira-Sales *et al.*, 2013). No presente estudo, houve uma marcante diminuição da proteinúria nos animais tratados com 1 ou 2 doses de CTmLA, tanto na análise realizada aos 30 dias como aos 60 dias. Resultados semelhantes, de redução da proteinúria após a inoculação de CTm derivadas da MO em modelo de ablação 5/6, foram demonstrados com múltiplas doses endovenosas de CT, 2, 4 e 6 semanas após a cirurgia de nefrectomia (Semedo *et al.*, 2009). Estes achados têm extrema relevância clínica, considerando-se as limitadas estratégias terapêuticas disponíveis para tratamento da proteinúria, destacando-se os bloqueadores do sistema renina angiotensina, quer sejam os inibidores da enzima de conversão da angiotensina ou bloqueadores de receptores da angiotensina II (Graciano *et al.*, 2004; Fujihara *et al.*, 2000).

Os mecanismos envolvidos na redução da proteinúria induzidos pela CTm não estão claros. Aparentemente, os efeitos benéficos devem ser consequência de efeitos sobre os componentes glomerulares. Considerando que os podócitos estão intimamente associados aos mecanismos de proteinúria, é razoável associar o reestabelecimento da integridade e do número destas células, nos animais que receberam as CTmLA, à melhora da proteinúria. De fato, a expressão de WT-1, um fator de transcrição considerado marcador específico de podócitos (Mundel, 2016), que estava diminuída

em animais após o estabelecimento da lesão causada pela nefrectomia 5/6, aumentou nos animais tratados com 1 dose de CTmLA. Outro marcador podocitário analisado foi a sinaptopodina, um importante componente do citoesqueleto do podócito, com papel fundamental na manutenção da forma do pedicelo. A inoculação de 1 dose de CTmLA proporcionou recuperação da expressão de sinaptopodina nos glomérulos dos animais com nefrectomia 5/6, apesar deste efeito não ter se mantido após 60 dias, nem verificado após a inoculação da 2ª dose de CTm. Em trabalho anterior do nosso grupo, no modelo de podocitopatia induzido por puromicina, a inoculação precoce de CTm derivadas da MO também impediu a perda da expressão relativa de WT-1 (Ramalho, 2012), semelhante ao descrito para inoculações seriadas de CTm derivadas da MO em modelo de adriamicina (Zoja *et al.*, 2012). Outros autores descreveram que CTm protegem os podócitos ao induzirem maior expressão de sinaptopodina (Chang *et al.*, 2012), nefrina e podocina (Wang *et al.*, 2013), todas proteínas da fenda diafragmática. Os resultados aqui descritos mostram que o tratamento com CTmLA reestabeleceu o número e a integridade dos podócitos nos animais submetidos à nefrectomia 5/6, semelhantes aos encontrados nos animais controle (Sham).

O efeito renoprotetor das CTmLA foi comprovado também pela capacidade de impedir o desenvolvimento da esclerose glomerular. A administração de 1 dose de CT reduziu marcadamente a glomeruloesclerose, após 30 dias e mesmo após 60 dias, corroborando resultados de outros trabalhos que utilizaram CT em modelo de ablação renal (Cavaglieri *et al.*, 2009; Semedo *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Caldas *et al.*, 2015). Kunter e colaboradores administraram CTm 48 horas após a indução da glomerulonefrite experimental (modelo Thy 1.1, que induz mesangiólise) e constataram que houve preservação glomerular, bem como da função renal (Kunter *et al.*, 2007).

Deve ser ressaltado que a intensidade da redução dos índices de glomeruloesclerose varia de acordo com a via de inoculação das CT, sistêmica ou subcapsular. Quando a via de *delivery* das CT foi a sistêmica, a esclerose glomerular sofreu redução de 1,5 a 2,8 vezes em relação aos animais doentes (Semedo *et al.*, 2009, He *et al.*, 2012; Caldas *et al.*, 2015; Bian *et al.*, 2014). Já com a administração subcapsular, a taxa de glomeruloesclerose foi reduzida cerca de 5,1 vezes (Noronha *et al.*, 2011). No presente estudo a glomeruloesclerose foi reduzida 4,8 vezes em relação aos animais com a lesão instalada.

Considerando o exposto, os efeitos anti-proteinúricos das CTmLA estão possivelmente associados à capacidade deste tratamento de reestabelecer as funções glomerulares, com reversão dos índices de esclerose glomerular, além da restauração dos padrões de expressão dos podócitos e, portanto, da manutenção da barreira de filtração glomerular.

Apesar da inoculação de apenas 1 dose CTmLA ter sido efetiva em diminuir a excreção de proteína urinária e a pressão arterial no modelo estudado, o efeito positivo sobre a creatinina sérica, um importante parâmetro de função renal, não seguiu em paralelo. Estudos anteriores no nosso laboratório mostraram uma melhora dos níveis de creatinina sérica nos animais tratados com CTm derivadas da MO e CTmLA, porém quando o tratamento foi feito de forma preventiva e não na doença instalada (Cavaglieri *et al.*, 2009; Noronha *et al.*, 2011). O mesmo efeito sobre a creatinina sérica foi relatado por outros autores, em modelo de glomerulonefrite Thy-1.1 (Kunter *et al.*, 2006; Kunter *et al.*, 2007) e em síndrome de Alport (Sugimoto *et al.*, 2006). Melhora dos níveis de creatinina foi descrita em estudo onde três doses de CTmMO foram administradas em modelo de nefrectomia 5/6 (Semedo *et al.*, 2009).

A fibrose intersticial é o parâmetro que mais se correlaciona com a progressão da DRC em pacientes com diferentes etiologias de doença renal (Noronha *et al.*, 1997). O presente estudo demonstrou efeitos limitados do uso de dose única de CTmLA sobre a porcentagem da área de fibrose intersticial, comprovado tanto por análise histológica como pelos níveis de expressão gênica de fibronectina e colágeno I, dois importantes componentes da matriz extracelular. O tratamento com CTmLA não reduziu a expressão da fibronectina e, inclusive, aumentou a expressão relativa do colágeno I.

Melhora na fibrose intersticial foi obtida nos animais que receberam 2 doses de CTmLA, semelhante aos resultados descritos com o uso de CTm de tecido adiposo em modelo de estenose da artéria renal (Ebrahimi *et al.*, 2013) e de CTm derivadas da MO em modelo de nefrectomia 5/6 (Semedo *et al.*, 2009). Ambos os estudos descreveram efeitos positivos na fibrose intersticial associados à inoculação de múltiplas doses de CT. No presente estudo, apesar do tratamento com CTmLA não ter mostrado efeitos na fibrose intersticial e em componentes da matriz extracelular, a administração de CTmLA promoveu uma redução significativa da expressão de α -SMA, portanto, de miofibroblastos.

Outra achado importante sobre o efeito protetor das CTmLA na DRC foi no infiltrado de macrófagos no tecido renal. De fato, o marcante infiltrado de macrófagos na área do interstício renal dos animais submetidos à nefrectomia 5/6 foi reduzido com o tratamento com 1 dose de CTmLA. Resultados semelhantes foram demonstrados pelo nosso grupo, com CTmLA administradas no dia da indução da lesão (Cavaglieri *et al.*, 2009; Noronha *et al.*, 2011), e também descritos em modelo de transplante renal tratados com CTm derivadas da MO (Franquesa *et al.*, 2012).

A subpopulação de macrófagos conhecida por seus efeitos pró-inflamatórios é denominada M1, a qual é classicamente ativada pela presença de IFN- γ no microambiente e se mantém ativada na presença de citocinas como TNF- α . Na DRC, a população M1 atua na fase inflamatória inicial. Os macrófagos M2 estão comprometidos com a recuperação da homeostase, possuem efeito anti-inflamatório e atuam no remodelamento tecidual. Estas células são ativadas por uma via alternativa, na presença de IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β . Na DRC, os macrófagos M2 atuam no processo de cicatrização e fibrose decorrente do insulto inicial (Wise *et. al.*, 2012).

CTm recrutam monócitos e macrófagos para os sítios de inflamação e regulam a polarização de macrófagos M1 para M2, diminuindo a secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-6, aumentando a secreção de IL-10 e estimulando a atividade fagocítica dos macrófagos (English *et. al.*, 2013), assim contribuindo para o reestabelecimento da homeostase. Em modelos experimentais, as CTm foram capazes de diminuir a infiltração de macrófagos no rim de animais com DRC (Wise *et. al.*, 2012).

Uma das possíveis explicações sobre os efeitos benéficos das CTm na injúria renal é o seu efeito imunomodulador. No presente estudo, IL-1 β , TNF- α , MCP-1 e RANTES, fatores considerados pró-inflamatórios, foram significativamente menos expressos no grupo tratado com CTmLA. Como IL-1 β e TNF- α estão diretamente relacionadas à ativação dos macrófagos M1, e MCP-1 e RANTES atuam no recrutamento de células inflamatórias adicionais para o local da lesão tecidual, a diminuição local destes fatores pode estar vinculada à diminuição do infiltrado de macrófagos observada neste estudo. Além disso, foi observado na análise aos 30 dias, que os animais que receberam 1 dose de CTmLA, apresentaram uma tendência ao aumento da expressão gênica de citocinas Th2, IL4 e IL10, envolvidas na regulação da

inflamação (Hanson *et al.*, 2013). Tomados em conjunto, estes dados sugerem que as CTmLA podem estar induzindo um microambiente local predominantemente anti-inflamatório. Tögel e colaboradores reportaram que a proteção renal induzida pelas CTm em modelo de lesão renal aguda isquêmica seria mediada pela inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e estímulo da expressão de citocinas anti-inflamatórias (Tögel *et al.*, 2005).

Finalmente, merece discussão a situação de xenotransplante definida pelo desenho do presente estudo, no qual CTmLA humanas foram inoculadas em rins de ratos. Este e outros estudos comprovam que a administração de CT não induz rejeição. CT são consideradas células imunoprivilegiadas que apresentam efeitos imunossupressores, bloqueando a atividade de linfócitos T CD4+, CD8+, células NK e linfócitos B (Shi *et al.*, 2011). Devido à baixa expressão de MHC classe I e ausência da expressão de MHC classe II e de moléculas co-estimulatórias, as CT escapam do reconhecimento pelo sistema imune e não induzem a resposta imune adaptativa (Feng *et al.*, 2013).

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o tratamento com CTmLA no modelo de DRC instalada, foi capaz de bloquear a progressão da lesão renal, resultando na melhora da pressão arterial, da proteinúria e da glomeruloesclerose. O tratamento com CTmLA na DRC instalada não promoveu melhora dos níveis de creatinina séria e da fibrose intersticial. Os mecanismos envolvidos neste processo não estão claros, mas podem estar relacionados com o reestabelecimento da integridade e da população de podócitos, verificados pelo aumento da expressão dos marcadores WT1 e sinaptopodina. Além disso, a diminuição do número de miofibroblastos e de macrófagos no tecido renal, relacionado com os

possíveis efeitos imunomoduladores desencadeado por estas células, pode ter sido responsável por parte do efeito benéfico do tratamento com CTmLA.

VII. RESUMO DOS RESULTADOS

1. A inoculação de CTmLA em modelo de nefrectomia 5/6 com a lesão instalada proporcionou efeitos benéficos, caracterizados pelo bloqueio da progressão da DRC.
2. Os efeitos renoprotetores das CTmLA neste modelo incluíram a melhora da pressão arterial, marcante diminuição da proteinúria e da glomeruloesclerose.
3. Os mecanismos envolvidos neste processo não estão claros, mas podem estar relacionados com o reestabelecimento da integridade e da população de podócitos, verificados pelo aumento da expressão dos marcadores WT1 e sinaptopodina. Além disso, a diminuição do número de miofibroblastos e de macrófagos no tecido renal pode ter sido responsável por parte do efeito benéfico do tratamento com CTmLA
4. O tratamento com CTmLA na DRC instalada não promoveu melhora dos níveis de creatinina séria e da fibrose intersticial.
5. A inoculação de CTmLA em tempos diferentes (2 doses) na nefropatia crônica já instalada e avaliada a longo prazo, mostrou efeitos benéficos sobre a pressão arterial e a proteinúria. Além disso, de forma surpreendente, contribuiu para reduzir a fibrose intersticial.
6. A inoculação de 2 doses de CTmLA não teve impacto adicional nos parâmetros de creatina sérica, glomeruloesclerose, regeneração podocitária ou sobre o infiltrado de macrófagos.

VIII. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram que a administração de uma dose de CTmLA no modelo de nefrectomia 5/6 com a lesão já instalada foi efetiva em bloquear a progressão da DRC.

A inoculação de uma segunda dose de CTmLA não resultou em efeitos benéficos adicionais em relação aos efeitos verificados na administração de uma dose, exceto na pressão arterial, proteinúria e fibrose intersticial.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABRAMOVICH DR & PAGE KR. Pathways of water exchange in the fetoplacental unit at mid-pregnancy. **J Obstet Gynaecol Br Commonw.** 1972, 79(12):1099-1102.
- AGGARWAL S & PITTENGER MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood.** 2005, 105:1815-1822.
- AL-HUSSEINY F, SOBH MA, ASHOUR RH, FOUD S, MEDHAT T, EL-GILANY AH, ELGHANNAM D, ABDEL-GHAFFAR H, SAAD MA, SOBH M. Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells Cut Short the Acuteness of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Sprague-Dawley Rats. **Int J Stem Cells.** 2016, 9(1):70-78.
- ANDERSON S, MEYER TW, RENNKE HG, BRENNER BM. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. **J Clin Invest.** 1985, 76:612-619.
- ANGLANI F, FORINO M, DEL PRETE D, TOSETTO E, TORREGROSSA R, D'ANGELO A. In search of adult renal stem cells. **J Cell Mol Med.** 2004, 8:474-487.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRASNPALNTE DE ÓRGÃOS - Disponível em:
- BAGHERPOOR AJ, DOLEZALOVA D, BARTA T, KUČÍREK M, SANI SA, EŠNER M, KUNOVA BOSAKOVA M, VINARSKÝ V, PESKOVA L, HAMPL A, ŠTROS M. Properties of Human Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Derivatives Depend on Nonhistone DNA-Binding HMGB1 and HMGB2 Proteins. **Stem Cells Dev.** 2017, 26(5):328-340.
- BANKI NF, VER A, WAGNER LJ, VANNAY A, DEGRELL P, PROKAI A. Aldosterone antagonists in monotherapy are protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. **PLoS One.** 2012, 7(6):e39938.
- BARTHOLOMEW A, STURGEON C, SIATSKAS M. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Exp Hematol.** 2002, 30:42-48.
- BARTON M. & SOROKIN A. Endothelin and the glomerulus in chronic kidney disease. **Semin Nephrol.** 2015, 35(2):156-167.
- BIAN X, ZHANG B, GUO W, LIU N, BAI Y, MIAO J, ZHAO G, LIU B, WANG S, MA L, ZHENG L, ZHAO Y, LI D, FENG J. Effects of mesenchymal stem cells transplanted at different time points in a rat remnant kidney model. **Am J Nephrol.** 2014, 39(1):75-84.

- BONVENTRE JV. Molecular response to cytotoxic injury: role of inflammation, MAP kinases, and endoplasmic reticulum stress response. *Semin Nephrol.* 2004, 23:439-48.
- BOYER LA, LEE TI, COLE MF, JOHNSTONE SE, LEVINE SS, ZUCKER JP, GUENTHER MG, KUMAR RM, MURRAY HL, JENNER RG, GIFFORD DK, MELTON DA, JAENISCH R, YOUNG RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 2005, 122(6):947-956.
- BRACE RA. Progress toward understanding the regulation of amniotic fluid volume: water and solute fluxes in and through the fetal membranes. *Placenta.* 1995, 16(1):1-18.
- BRENNER BM. Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol.* 1985, 249:324-337.
- CALDAS HC, FERNANDES IM, GERBI F, SOUZA AC, BAPTISTA MA, RAMALHO HJ, KAWASAKI-OYAMA RS, GOLONI-BERTOLLO EM, PAVARINO-BERTELLI EC, BRAILE DM, ABBUD-FILHO M. Effect of whole bone marrow cell infusion in the progression of experimental chronic renal failure. *Transplant Proc.* 2008, 40(3):853-5.
- CALDAS HC, DE PAULA COUTO TA, FERNANDES IM, BAPTISTA MA, KAWASAKI-OYAMA RS, GOLONI-BERTOLLO EM, BRAILE DM, ABBUD-FILHO M. Comparative effects of mesenchymal stem cell therapy in distinct stages of chronic renal failure. *Clin Exp Nephrol.* 2015, 19(5):783-789.
- CALVIN SE & OYEN ML. Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with an emphasis on fracture properties. *Ann N Y Acad Sci.* 2007, 1101:166-185.
- CAPLAN AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991, 9:641-650.
- CASTRO-MALASPINA H, GAY RE, RESNICK G, KAPOOR N, MEYERS P, CHIARIERI D, MCKENZIE S, BROXMEYER HE, MOORE MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 1980, 56:289-301.
- CAVAGLIERI RC, MARTINI D, SOGAYAR MC, NORONHA IL. Mesenchymal Stem Cells Delivered at the Subcapsule of the Kidney Ameliorate Renal Disease in the Rat Remnant Kidney Model. *Transpl Proceed.* 2009, 41:947-951.
- CHAMBERLAIN G, FOX J, ASHTON B, MIDDLETON J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007, 25(11):2739-2749.

- CHANG JW, TSAI HL, CHEN CW, YANG HW, YANG AH, YANG LY, WANG PS, NG YY, LIN TL, LEE OK. Conditioned mesenchymal stem cells attenuate progression of chronic kidney disease through inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and immune modulation. **J Cell Mol Med.** 2012, 16 (12):2935-2949.
- CHEN YT, SUN CK, LIN YC, CHANG LT, CHEN YL, TSAI TH, CHUNG SY, CHUA S, KAO YH, YEN CH. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. **J Transl Med.** 2011, 9:51-68.
- CHOI S, PARK M, KIM J, HWANG S, PARK S, LEE Y. The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of the chronic renal failure. **Stem Cells Dev.** 2009, 18:521-529.
- CRESPIGNY L, ROBINSON HP, NGU A. Pain with amniocentesis and transabdominal CVS. **Aust N Z J Obstet Gynaecol.** 1990, 30(4):308-319.
- DA SACCO S, SEDRAKYAN S, BOLDRIN F, GIULIANI S, PARNIGOTTO P, HABIBIAN R, WARBURTON D, DE FILIPPO RE, PERIN L. Human amniotic fluid as a potential new source of organ specific precursor cells for future regenerative medicine applications. **J Urol.** 2010, 183(3):1193-1200.
- DE COPPI P, BARTSCH G JR, SIDDIQUI MM, XU T, SANTOS CC, PERIN L, MOSTOSLAVSKY G, SERRE AC, SNYDER EY, YOO JJ, FURTH ME, SOKER S, ATALA A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nat Biotechnol.** 2007, 25(1):100-116.
- DE COPPI P, CALLEGARI A, CHIAVEGATO A, GASPAROTTO L, PICCOLI M, TAIANI J, POZZOBON M, BOLDRIN L, OKABE M, COZZI E, ATALA A, GAMBA P, SARTORE S. Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. **J Urology.** 2010, 177:369-376.
- DELLÊ H, ROCHA JR, CAVAGLIERI RC, VIEIRA JM JR, MALHEIROS DM, NORONHA IL. Antifibrotic effect of tamoxifen in a model of progressive renal disease. **J Am Soc Nephrol.** 2012, 23(1):37-48.
- DING DC, SHYU WC, LIN SZ, LIU HW, CHIOU SH, CHU TY. Human umbilical cord mesenchymal stem cells support nontumorigenic expansion of human embryonic stem cells. **Cell Transplant.** 2012, 21(7):1515-1527.
- DI NICOLA M, CARLO-STELLA C, MAGNI M, MILANESI M, LONGONI PD. Suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood.** 2002, 99:3838-3843.

- DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. 2006, 8(4):315-317.
- DUENHOELTER JH, PRITCHARD JA. Fetal respiration: quantitative measurements of amniotic fluid inspired near term by human and rhesus fetuses. **Am J Obstet Gynecol**. 1976, 125(3):306-309.
- DUFFIELD JS. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. **J Clin Invest**. 2014, 124(6):2299-2306.
- EBRAHIMI B, EIRIN A, LI Z, ZHU XY, ZHANG X, LERMAN A, TEXTOR SC, LERMAN LO. Mesenchymal stem cells improve medullary inflammation and fibrosis after revascularization of swine atherosclerotic renal artery stenosis. **PLoS One**. 2013 8(7):e67474.
- EDDY AA. Can renal fibrosis be reversed? **Pediatr Nephrol**. 2005, 20(10):1369-1375.
- EDDY AA. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis. **Kidney Internat Supplements**. 2014, 4:2-8.
- ENGLISH K & WOOD JK. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2013, 3:015560.
- ESPOSITO C, VILLA L, GROSJEAN F, MANGIONE F, ESPOSITO V, CASTOLDI F, SERPIERI N, ARRA M, PERTILE E, MAGGI N, VALENTINO R, DAL CANTON A. Rapamycin reduces proteinuria and renal damage in the rat remnant kidney model. **Transplant Proc**. 2009, 41(4):1370-1371.
- FENG J, ZHAO L, DENG H, WEI M, LI J, XU K. Immune tolerance of amniotic fluid stem cell-induced rat kidney graft and influences on oxidative stress. **Transplant Proc**. 2013, 45:3394-401.
- FORTIER LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. **Vet Surg**. 2005, 34(5):415-423.
- FRAGIADAKI M. & MASON RM. Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis - evidence for and against. **Int J Exp Pathol**. 2011, 92(3):143-150.
- FRANQUESA M, HERRERO E, TORRAS J, RIPOLL E, FLAQUER M, GOMÀ M, LLOBERAS N, ANEGON I, CRUZADO JM, GRINYÓ JM, HERRERO-FRESNEDA I. Mesenchymal stem cell therapy prevents interstitial fibrosis and tubular atrophy in a rat kidney allograft model. **Stem Cells Dev**. 2012, 21(17):3125-3135.

- FRIEDENSTEIN AJ, GORSKAJA JF, KULAGINA NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol.** 1976, 4:267-274.
- FUJIHARA CK, NORONHA IL, MALHEIROS DMA, ANTUNES G.R, OLIVEIRA IB, ZATZ R. Combined mycophenolate mofetil and losartan therapy arrest established injury in the remnant kidney. **J Am Soc Nephrol.** 2000, 11:283-290.
- FUJIHARA CK, VELHO M, MALHEIROS DM, ZATZ R. An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. **Kidney Int.** 2005, 67:1913-1924.
- FURUICHI K, SHINTANI H, SAKAI Y, OCHIYA T, MATSUSHIMA K, KANEKO S AND WADA T. Effects of adipose-derived mesenchymal cells on ischemia-reperfusion injury in kidney. **Clin Exp Nephrol.** 2012, 16:679-689.
- GOSDEN CM. Amniotic fluid cell types and culture. **Br Med Bull.** 1983, 39(4):348-354.
- GRACIANO ML, CAVAGLIERI RC, DELLÊ H, DOMINGUEZ WV, CASARINI DE, MALHEIROS DM, NORONHA IL. Intrarenal Renin-Angiotensin system is upregulated in experimental model of progressive renal disease induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **J Am Soc Nephrol.** 2004, 15:1805-1815.
- GRAMS M.E. & CORESH J. Assessing risk in chronic kidney disease: a methodological review. **Nat Rev Nephrol.** 2013, 9(1):18-25.
- GUAN K, ROHWEDEL J, WOBUS AM. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. **Cytotechnology.** 1999, 30:211-226.
- GURKAN UA & AKKUS O. The mechanical environment of bone marrow: a review. **Ann Biomed Eng.** 2008, 36(12):1978-1991.
- HANSON S. E., JAEHYUP KIM; AND PEIMAN HEMATTI. Comparative Analysis of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Isolated From Abdominal and Breast Tissue. **Aesthetic Surgery Journal.** 2013, 33(6):888-898.
- HAUSER PV, DE FAZIO R, BRUNO S, SDEI S, GRANGE C, BUSSOLATI B, BENEDETTO C, CAMUSSI G. Stem cells derived from human amniotic fluid contribute to acute kidney injury recovery. **Am J Pathol.** 2010, 177(4):2011-2021.
- HE J, WANG Y, SUN S, YU M, WANG C, PEI X, ZHU B, WU J, ZHAO W. Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in the mouse remnant kidney model. **Nephrology (Carlton).** 2012, 17(5):493-500.

- HEDRIANA HL & MOORE TR. Accuracy limits of ultrasonographic estimation of human fetal urinary flow rate. **Am J Obstet Gynecol.** 1994, 171(4):989-992.
- HOEHN H, BRYANT EM, KARP LE, MARTIN GM. Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. II. Cytogenetic parameters as functions of clonal type and preparative technique. **Clin Genet.** 1975, 7(1):29-36.
- HORWITZ EM, LE BLANC K, DOMINICI M, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, DEANS RJ, KRAUSE DS, KEATING A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy.** 2005, 7(5):393-395.
- HORWITZ EM & DOMINICI M. How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? **Cytotherapy.** 2008, 10(8):771-774.
- HUMEAU L, BARDIN F, MAROC C, ALARIO T, GALINDO R, MANNONI P, CHABANNON C. Phenotypic, molecular, and functional characterization of human peripheral blood CD34+/THY1+ cells. **Blood.** 1996, 87(3):949-955.
- INT ANKER PS, SCHERJON SA, KLEIJBURG-VAN DER KEUR C, NOORT WA, CLAAS FH, WILLEMZE R, FIBBE WE, KANHAI HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood.** 2003, 102(4):1548-1559.
- JANZ FDE L, DEBES ADE A, CAVAGLIERI RDE C, DUARTE SA, ROMÃO CM, MORÓN AF, ZUGAIB M, BYDLOWSKI SP. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. **J Biomed Biotechnol.** 2012, 2012:649353
- JANZ FL. Características de expansão, diferenciação e criopreservação de células-tronco mesenquimais obtidas do líquido amniótico no segundo trimestre de gestação [tese]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2010.
- JAUNIAUX E, WATSON A, BURTON G. Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks' gestation. **Am J Obstet Gynecol.** 2001, 184(5):998-1003.
- KINOMURA M, KITAMURA S, TANABE K, ET AL: Amelioration of cisplatin-induced acute renal injury by renal progenitor-like cells derived from the adult rat kidney. **Cell Transplant.** 2008, 17:143-58.
- KUNTER U, RONG S, DJURIC Z, BOOR P, MULLER-NEWEN YU D, FLOEGE J. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. **J Am Soc Nephrol.** 2006, 17:2202-12.

- KUNTER U, RONG S, BOOR P, EITNER F, MULLER-NEWEN G, DJURIC Z, ROEYEN CR, KONIECZNY A, OSTENDORF T, VILLA L, MILOVANCEVA-POPOVSKA M, KERJASCHKI D, FLOEGE J. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. **J Am Soc Nephrol.** 2007, 18:1754-1764.
- KURJAK A, KIRKINEN P, LATIN V, IVANKOVIC D. Ultrasonic assessment of fetal kidney function in normal and complicated pregnancies. **Am J Obstet Gynecol.** 1981, 141(3):266-270.
- LANGE C, TÖGEL F, ITTRICH H, CLAYTON F, NOLTE-ERNSTING C, ZANDER AR, WESTENFELDER C. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. **Kidney Int.** 2005, 68(4):1613-1617.
- LEE SR, LEE SH, MOON JY, PARK JY, LEE D, LIM SJ, JEONG KH, PARK JK, LEE TW, IHM CG. Repeated administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improved the protective effects on a remnant kidney model. **Ren Fail.** 2010, 32(7):840-848.
- LI B, MORIOKA T, UCHIYAMA M, ET AL. Bone marrow cell infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat model. **Kidney Int.** 2006, 69: 323-330.
- LIN F, CORDES K, LI L, HOOD L, COUSER WG, SHANKLAND SJ, IGARASHI P. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. **J Am Soc Nephrol.** 2003, 14:1188-1199.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.** 2001, 25(4):402-408
- LOCATELLI F, GIORGIANI G., BERGAMI E. Cord blood: a new source of hematopoietic stem cells. **Haematologica Reports.** 2006.
- LOTGERING FK, WALLENBURG HC. Mechanisms of production and clearance of amniotic fluid. **Semin Perinatol.** 1986, 10(2):94-102.
- MARTIN GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci.** 1981, 78(12):7634-7638.
- MESCHER EJ, PLATZKER AC, BALLARD PL, KITTERMAN JA, CLEMENTS JA, TOOLEY WH. Ontogeny of tracheal fluid, pulmonary surfactant, and plasma corticoids in the fetal lamb. **J Appl Physiol.** 1975, 39(6):1017-1021.

- MIAS C, TROUCHE E, SEGUELAS MH, CALCAGNO F, DIGNAT-GEORGE F, SABATIER F, PIERCECCHI-MARTI MD, DANIEL L, BIANCHI P, CALISE D, BOURIN P, PARINI A, CUSSAC D. Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. **Stem Cells** 2008, 26:1749-1757
- MINEI LJ & SUZUKI K. Role of fetal deglutition and micturition in the production and turnover of amniotic fluid in the monkey. **Obstet Gynecol.** 1976, 48(2):177-181.
- MORIGI M, IMBERTI B, ZOJA C, CORNA D, TOMASONI S, ABATE M, ANGIOLETTI RS, BENIGNI A, PERICO N, ALISON M, REMUZZI G. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. **J Am Soc Nephrol.** 2004, 15:1794-1804.
- MORIGI M, ROTA C, MONTEMURRO T, ET AL. Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. **Stem Cells.** 2010, 28:513-522.
- MULLER F, DOMMERGUES M, VILLE Y, LEWIN F, DELVALEZ-MORICHON N, NIHOUL-FEKETE C, BARGY F, DUMEZ Y, BOUE A. Amniotic fluid digestive enzymes: diagnostic value in fetal gastrointestinal obstructions. **Prenat Diagn.** 1994, 14(10):973-979.
- MUNDEL P. Podocyte-Targeted Treatment for Proteinuric Kidney Disease. **Semin Nephrol.** 2016, 36(6):459-462.
- NAHAS AM, MUCHANETA-KUBARA EC, ESSAWY M, SOYLEMEZOGLU O. Renal fibrosis: insights into pathogenesis and treatment. **Int J Biochem Cell Biol.** 1997, 29:55-62.
- NATH KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. **Am J Kidney Dis.** 1992, 20:1-17.
- NATH KA. The tubulointerstitium in progressive renal disease. **Kidney Int.** 1998, 54:992-994.
- NAUTA AJ, KRUISSELBRINK AB, LURVINK E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte derived dendritic cells. **J Immunol.** 2006, 177:2080-2087.
- NAVARRO-ALVAREZ N, SOTO-GUTIERREZ A, YUASA T, YAMATSUJI T, SHIRAKAWA Y, NAGASAKA T, SUN SD, JAVED MS, TANAKA N, KOBAYASHI N. Long-term culture of Japanese human embryonic stem cells in feeder-free conditions. **Cell Transplant.** 2008, 17:27-33.

- NINICHUK V, GROSS O, SEGERER S, HOFFMANN R, RADOMSKA E, BUCHSTALLER A, HUSS R, AKIS N, SCHLÖNDORFF D, ANDERS HJ. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen 4A3-deficient mice. **Kidney Int.** 2006, 70:121-129.
- NORONHA IL, SCHOR N, COELHO SN, JORGETTI V, ROMÃO JÚNIOR JE, ZATZ R, BURDMANN EA. Nephrology, dialysis and transplantation in Brazil. **Nephrol Dial Transplant.** 1997, 12(11):2234-2243.
- NORONHA IL, CAVAGLIERI RC, JANZ FL, DUARTE SA, LOPES MA, ZUGAIB M, BYDLOWSKI SP. The potential use of stem cells derived from human amniotic fluid in renal diseases. **Kidney Int Suppl.** 2011, (3):77-82.
- NWANKWO E, BELLO AK, EL NAHAS AM. Chronic kidney disease: stemming the global tide. **Am J Kidney Dis.** 2005, 45(1):201-208.
- ODORICO JS, KAUFMAN DS, THOMSON JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells.** 2001, 19:193-204.
- OKAMOTO OK & CAMPOS AH. Perspectivas em terapia celular: Célula Tronco. **Einstein.** 2004, 2:313-317.
- OLIVEIRA-SALES EB, VARELA VA, MAQUIGUSSA E, BORGES FT, SHIMOURA CG, GOMES G, CAMPOS RR, BOIM MA. Renovascular hypertension: Effects of mesenchymal stem cells in the contralateral hypertensive kidney in rats. **Clin Exp Hypertens.** 2016, 38(7):586-593.
- OLVER RE & STRANG LB. Ion fluxes across the pulmonary epithelium and the secretion of lung liquid in the foetal lamb. **J Physiol.** 1974, 241(2):327-357.
- PAREKKADAN B & MILWID JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. **Annu Rev Biomed Eng.** 2010, 12:87-117.
- PERIN L, GIULIANI S, JIN D, SEDRAKYAN S, CARRARO G, HABIBIAN R, WARBURTON D, ATALA A, DE FILIPPO RE. Renal differentiation of amniotic fluid stem cells. **Cell Prolif.** 2007, 40(6):936-948.
- PERIN L, SEDRAKYAN S, GIULIANI S, DA SACCO S, CARRARO G, SHIRI L, LEMLEY KV, ROSOL M, WU S, ATALA A, WARBURTON D, DE FILIPPO RE. Protective effect of human amniotic fluid stem cells in an immunodeficient mouse model of acute tubular necrosis. **PLoS One.** 2010, 5(2):e9357.
- PHERMTHAI T, ODGLUN Y, JULAVIJITPHONG S, TITAPANT V, CHUENWATTANA P, VANTANASIRI C, PATTANAPANYASAT K. A novel method to derive amniotic fluid stem cells for therapeutic purposes. **BMC Cell Biol.** 2010, 11:79.

- 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., AND MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science** 1999, 284:143-147.
- POULSOM R, FORBES SJ, HODIVALA-DILKE K, RYAN E, WYLES S, NAVARATNARASAH S, JEFFERY R, HUNT T, ALISON M, COOK T, PUSEY C, WRIGHT NA. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. **J Pathol.** 2001, 195:229-235.
- PROCKOP DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science.** 1997, 276(5309):71-74.
- PRUSA AR, MARTON E, ROSNER M, BERNASCHEK G, HENGSTSCHLÄGER M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? **Hum Reprod.** 2003 18(7):1489-93.
- QUESENBERRY P, GOLDBERG L. A revisionist history of adult marrow stem cell biology or they forgot about the discard. **Leukemia.** 2017, 31(8):1678-1685.
- RAMALHO RJ. Infusão de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea em modelo experimental de nefropatia crônica induzida por lesões de podócitos [tese]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.
- RICARDO SD & DEANE JA. Adult stem cells in renal injury and repair. **Nephrology** 2005, 10:276-282.
- ROCHA DE OLIVEIRA F. Líquido amniótico: perfil bioquímico do desenvolvimento renal e fetal [tese]. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.
- ROTA C, IMBERTI B, POZZOBON M, PICCOLI M, DE COPPI P, ATALA A, GAGLIARDINI E, XINARIS C, BENEDETTI V, FABRICIO AS, SQUARCINA E, ABBATE M, BENIGNI A, REMUZZI G, MORIGI M. Human amniotic fluid stem cell preconditioning improves their regenerative potential. **Stem Cells Dev.** 2012, 21(11):1911-1923.
- SCHENA FP & E ABBATTISTA MR. Stem cells: Reparative medicine and nephrology. **J Nephrol.** 2003, 16:S1-S5.
- SEDRAKYAN S, DA SACCO S, MILANESI A, SHIRI L, PETROSYAN A, VARIMEZOVA R, WARBURTON D, LEMLEY KV, DE FILIPPO RE, PERIN L. Injection of amniotic fluid stem cells delays progression of renal fibrosis. **J Am Soc Nephrol.** 2012, 23(4):661-673.
- SEMEDO P, WANG PM, ANDREUCCI TH, CENEDEZE MA, TEIXEIRA VP, REIS MA, PACHECO-SILVA A, CÂMARA NO. Mesenchymal stem cells ameliorate tissue damages triggered by renal ischemia and reperfusion injury. **Transplant Proc.** 2007, 39:421-433.

- SEMEDO P, CORREA-COSTA M, CENEDEZE MA, MALHEIROS DM, ANTONIA DOS REIS M, SHIMIZU MH, SEGURO AC, PACHECO-SILVA A, CÂMARA NO. Mesenchymal Stem Cells Attenuate Renal Fibrosis Through Immune Modulation and Remodeling Properties in a Rat Remnant Kidney Model. **Stem Cells**. 2009, 27(12):3063-3073
- SHEASHAA H, LOTFY A, ELHUSSEINI F, AZIZ AA, BAIOMY A AWAD S, ALSAYED A, EL-GILANY AH, SAAD MA, MAHMOUD K, ZAHRAN F, SALEM DA, SARHAN A, GHAFAR H, SOBH M. Protective effect of adipose-derived mesenchymal stem cells against acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion in Sprague-Dawley rats. **Exp Ther Med**. 2016, 11(5):1573-1580.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA – Disponível em: <https://sbn.org.br/jbn-jornal-brasileiro-de-nefrologia/>
- STOCKERL-GOLDSTEIN KE, REDDY SA, HORNING SF, BLUME KG, CHAO NF, HU WW, JOHNSTON LF, LONG GD, STROBER S, WONG RM, FEINER RH, KOBLER S, NEGRIN RS. Favorable treatment outcome in non-Hodgkin's lymphoma patients with "poor" mobilization of peripheral blood progenitor cells. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2000, 6(5):506-512.
- STREUBEL B, MARTUCCI-IVESSA G, FLECK T, BITTNER RE. In vitro transformation of amniotic cells to muscle cells--background and outlook. **Wien Med Wochenschr**. 1996, 146(9-10):216-217.
- SUDULAGUNTALA A, GURUNG S, NANJWADE BK, TAMANG JK. A review: stem cells and classification of stem cells. **World J Pharm. Pharmaceutical Sci**. 2016, 11:534-556.
- SUGIMOTO H, MUNDEL TM, SUND M, XIE L, COSGROVE D, KALLURI R. Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. **Proc Natl Acad**. 2006, 103:7321-7326.
- SUN D, BU L, LIU C, YIN Z, ZHOU X, LI X, XIAO A. Therapeutic Effects of Human Amniotic Fluid-Derived Stem Cells on Renal Interstitial Fibrosis in a Murine Model of Unilateral Ureteral Obstruction **PLoS One**. 2013, 8(5):e65042.
- SUN JH, TENG GJ, MA ZL, JU SH. In vivo monitoring of magnetically labeled mesenchymal stem cells administered intravascularly in rat acute renal failure. **Swiss Med Wkly**. 2008, 12:404-412.
- TAKAKUTA K, FUJIMORI A, CHIKANISHI T, TANOKURA A, IWATSUKI Y, YAMAMOTO M, NAKAJIMA H, OKADA M, ITOH H. Renoprotective properties of pirfenidone in subtotaly nephrectomized rats. **Eur J Pharmacol**. 2010, 629(1-3):118-124.

- THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. **Erratum in: Science** 1998, 282(5395):1827.
- THOMSON JA & MARSHALL VS. Primate embryonic stem cells. **Curr Top Dev Biol**. 1998, 38:133-165.
- TÖGEL F, HU Z, WEISS K, ISAAC J, LANGE C, WESTENFELDER C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2005, 289(1):F31-42.
- TÖGEL F, WEISS K, YANG Y, HU Z, ZHANG P, WESTENFELDER C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2007, 292(5):F1626-35.
- TÖGEL F, COHEN A, ZHANG P, YANG Y, HU Z, WESTENFELDER C. Autologous and allogeneic marrow stromal cells are safe and effective for the treatment of acute kidney injury. **Stem Cells Dev**. 2009, 18(3):475-485.
- TSAI MS, LEE JL, CHANG YJ, HWANG SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. **Hum Reprod**. 2004, 19(6): 1450-1456.
- UNDERWOOD MA, WM GILBERT AND MP SHERMAN. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. **J Perinatol**. 2005, 25:341-348.
- VERFAILLIE CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biol**. 2002, 12:502-508.
- VILLANUEVA S, CARREÑO JE, SALAZAR L, VERGARA C, STRODTHOFF R, FAJRE F, CÉSPEDES C, SÁEZ PJ, IRARRÁZABAL C, BARTOLUCCI J, FIGUEROA F, VIO CP. Human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue reduce functional and tissue damage in a rat model of chronic renal failure. **Clin Sci (Lond)**. 2013, 125(4):199-210.
- WANG H, FU W, JIN Z, WANG Y, YAO W, YIN P, ET AL. Advanced IgA nephropathy with impaired renal function benefits from losartan treatment in rats. **Ren Fail**. 2013, 35(6):812-818.
- WISE AF & RICARDO SD. Mesenchymal stem cells in kidney inflammation and repair. **Nephrology (Carlton)**. 2012, 17(1):1-10.
- WLADIMIROFF JW & CAMPBELL S. Fetal urine-production rates in normal and complicated pregnancy. **Lancet**. 1974, 2;1(7849):151-154.

- WRIGHT WE, PIATYSZEK MA, RAINEY WE, BYRD W, SHAY JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. **Dev Genet.** 1996, 18(2):173-179.
- WU HJ, YIU WH, LI RX, WONG DWL, LEUNG JCK, CHAN LYY, ZHANG Y, LIAN Q, LIN M, TSE HF, LAI KN, TANG SCT. Mesenchymal Stem Cells Modulate Albumin-Induced Renal Tubular Inflammation and Fibrosis **PLoS One.** 2014, 9(3):e90883.
- YOON BS, MOON JH, JUN EK, KIM J, MAENG I, KIM JS, LEE JH, BAIK CS, KIM A, CHO KS, LEE JH, LEE HH, WHANG KY, YOU S. Secretory profiles and wound healing effects of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev.** 2010, 19(6):887-902.
- YOUNG HE & BLACK AC. Adult stem cells. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.** 2004, 276:75-102.
- ZOJA C, GARCIA PB, ROTA C, CONTI S, GAGLIARDINI E, CORNA D, ZANCHI C, BIGINI P, BENIGNI A, REMUZZI G, MORIGI M. Mesenchymal stem cell therapy promotes renal repair by limiting glomerular podocyte and progenitor cell dysfunction in adriamycin-induced nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol.** 2012, 303 (9):F1370-1381.
- ZOU Y, TONG HJ, LI M, TAN KS, CAO T. Telomere length is regulated by FGF-2 in human embryonic stem cells and affects the life span of its differentiated progenies. **Biogerontology.** 2017, 18(1):69-84.
- ZUGAIB M. Sistema amniótico. In Zugaib Obstetrícia. 2º edição. São Paulo, 2012.
- ZUGAIB M & NOMURA RMY. Sistema amniótico. 3º ed. São Paulo: editora Obstetrícia básica. 2006.