RODRIGO JOSÉ RAMALHO

**Infusão de células tronco mesenquimais
derivadas da medula óssea em
modelo experimental de nefropatia crônica
induzida por lesões de podócitos**

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
2012**

RODRIGO JOSÉ RAMALHO

**Infusão de células tronco mesenquimais
derivadas da medula óssea em
modelo experimental de nefropatia crônica
induzida por lesões de podócitos**

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

Programa de Nefrologia

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

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ramalho, Rodrigo José

Infusão de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea
em modelo experimental de nefropatia crônica induzida por lesão de
podócitos / Rodrigo José Ramalho. -- São Paulo, 2012.

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

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Irene de Lourdes Noronha.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Células-tronco mesenquimais
3.Podócitos 4.Proteinúria 5.Puromicina

USP/FM/DBD-421/12

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 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), auxílio nº 06/56628-4, assim como do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), auxílio nº 142137/2009-0 (bolsa de doutorado).

Dedicatória

***À minha amada esposa Ana Luiza,
companheira nesses anos todos,
agradeço a paciência e
compreensão para superar
a minha ausência.
Em alguns momentos só o seu amor
me deu forças e foi o que me bastou.***

***À minha querida mãe Vera,
pelo amor incondicional,
fonte de carinho infinito,
sendo sempre meu porto seguro
e capaz de tudo para me ver feliz.***

***Ao meu pai herói Horácio,
maior incentivador dessa jornada,
exemplo de homem, médico,
professor e amigo.
Obrigado por me ensinar tudo
da vida e da medicina
com tanto amor.***

***Ao meu irmão Renato,
que foi dar uma volta no mundo
e emprestou um pouco
da sua serenidade para
eu completar essa jornada.***

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Irene de Lourdes Noronha pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, testemunhando toda a sua energia e dedicação à nefrologia. Aliar a capacidade da assistência clínica com a excelência em pesquisa é a maior lição que aprendi. Obrigado por todos os ensinamentos e por sempre se preocupar com meu futuro sem se descuidar do meu presente.

Ao Prof. Luiz Fernando Onuchic, pelas sugestões pontuais no decorrer do projeto e a oportunidade do convívio diário, sempre à disposição para sanar minhas dúvidas nefrológicas.

À Prof^a. Denise Maria Avancini Costa Malheiros, pela valiosa contribuição nas análises histológicas, sugerindo e discutindo os resultados, assim como na orientação da microscopia eletrônica.

À Amanda Gonçalves Pires, agradeço a enorme ajuda nos experimentos, pois sem você ainda faltaria muita coisa para fazer. Seu futuro é brilhante e conte comigo no que precisar.

Ao Alexandre Chagas de Santana, companheiro durante todo esse período, companhia certa para um bolinho. Obrigado pela amizade fraternal.

Ao Filipe Miranda Silva, cuja evolução de menino para mestre passou diante dos meus olhos, obrigado por todo o suporte nesses anos.

À Cleonice da Silva, por todo dia me ensinar alguma coisa, quer seja sobre as técnicas do laboratório, comidas, livros, corridas, enfim... Sobre o que realmente importa na vida.

Ao William Pereira Felix, pela ajuda com a parte inicial dos experimentos. Que você continue esse cara estudioso e batalhador.

À Rita de Cassia Cavaglieri, por ter me ensinado toda a técnica de cultivo celular com paciência e carinho, estando sempre presente nos momentos de alegria.

Ao Wagner Vasques Dominguez, palmeirense e sofredor como eu, obrigado pela ajuda nos experimentos iniciais, nas dúvidas estatísticas e pela formidável contribuição na confecção da tese.

Aos amigos Humberto Dellê e Dimitri Marinotto, obrigado pelo período de convivência sempre alegre e com a inestimável contribuição na resolução dos problemas diários.

Ao Walter Campestre, agradeço pelo cuidado constante com os animais, as dicas gastronômicas-éticas e pelas boas gargalhadas que demos juntos nesses anos.

Aos amigos do laboratório, Adriana Castro, Carina Moreno, Elerson Costalonga, Flavia Oliveira, Hélio Cyrino, Hugo Ludovico, Pablo Mesquita, Priscila Queiroz e Renata Fantini agradeço pela companhia diária, compartilhando as angústias e os sucessos obtidos nesse período.

Aos ex e atuais alunos de iniciação científica Shirley, Thalita, Tatiana, Fernanda, Pamella, Carla, Virgínia, Rosana, Nayara, Luciana, Andressa, Leila, Daniel, Rafael e Adriano, agradeço a paciência e a ajuda na realização dos experimentos.

Aos demais colegas de LIM 29, Andressa, Ana Paula, Bruno, Crysthiane, Jonathan, Rodrigo, Fernanda, Mirtes e Zenaide, agradeço pelo excelente convívio e pela alegria de todos vocês.

Aos funcionários da microscopia eletrônica Miriam, Adão, Margot, Cecília e Marcelo, assim como a Prof^a Elia Caldini, obrigado por toda assistência na produção dos cortes e na aquisição das imagens.

Aos colegas do LIM 16, especialmente Prof. Roberto Zatz, Prof. Joel Heimann, Prof^a Vanda Jorgetti, Ivone, Luciene, Luzia, Karen, Fabiana e Denise, agradeço a disponibilidade constante para sanar eventuais dúvidas e pelo convívio diário.

Aos colegas do Hospital de Base de São José do Rio Preto e do Instituto de Urologia e Nefrologia, pela compreensão e cobertura das minhas eventuais ausências durante a realização do doutorado.

À minha família representada na figura dos meus tios Milton, Sueli, Dimas, Andréia, Ana Cláudia, Sérgio, Du, João Aris, Rita, Cristina, Walter, Maria Helena, Maria Augusta e Margarida (in memoriam), agradeço todo o carinho e torcida durante esses anos todos de estudos.

À minha querida vó Cida, obrigado por todo amor e apoio nesse período, sempre preocupada com as minhas idas e vindas.

***“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquentando e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”***

João Guimarães Rosa

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª.Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Lista de Siglas
Lista de Símbolos
Resumo
Summary

1. Introdução	1
1.1. Barreira de Filtração	1
1.1.1. Podócitos	2
1.1.2. Proteínas do domínio da membrana apical	6
1.1.3. Proteínas da fenda diafragmática	7
1.1.4. Proteínas do domínio da membrana basal	9
1.1.5. Podocitopatias	10
1.2. Modelo experimental de nefropatia crônica induzido por aminonucleosídeo de puromicina (PAN)	13
1.3. Células Tronco	15
1.4. Células Tronco e doenças renais	20
1.5. Diferenciação de Células Tronco em podócitos	22
2. Racional	24
3. Objetivos	26
4. Materiais e Métodos	28
4.1. Padronização do modelo PAN	28
4.2. Obtenção de Células Tronco	30
4.2.1. Extração de células da medula óssea e isolamento de CTm	30
4.2.2. Método de tripsinização	32
4.2.3. Cultivo e expansão das CTm	33
4.2.4. Caracterização das CTm por citometria de fluxo	33
4.2.5. Caracterização das CTm por diferenciação celular	35
4.2.6. Infusão e identificação das CTm no órgão alvo	37
4.3. Desenho do estudo	38
4.4. Metodologia	41
4.4.1. Parâmetros clínicos e laboratoriais	41
4.4.2. Histologia	43
4.4.3. Imunohistoquímica	46
4.4.4. Microscopia eletrônica	52
4.4.5. PCR em tempo real	53
4.5. Estudos <i>in vitro</i>	57
4.5.1. Isolamento, cultivo e caracterização de glomérulos <i>in vitro</i>	57
4.5.2. Cocultura de CTm e glomérulos	59
4.5.3. Cultura de CTm com colágeno IV	60
4.6. Análise estatística	63
5. Resultados	64
5.1. Padronização do modelo PAN	64
5.2. Obtenção de Células Tronco	64
5.2.1. Extração e isolamento de CTm	64
5.2.2. Caracterização das CTm por citometria de fluxo	66
5.2.3. Diferenciação <i>in vitro</i> das CTm em células osteogênicas	67

5.2.4. Diferenciação <i>in vitro</i> das CTm em células adipogênicas	68
5.3. Estudos <i>in vivo</i>	69
5.3.1. Infusão e identificação de CTm no órgão alvo	69
5.3.1.a) Padronização da infusão de CTm na região subcapsular	69
5.3.1.b) Marcação das CTm com CM-Dil	70
5.3.1.c) Cinética celular das CTm inoculadas em região subcapsular renal	70
5.3.2 Infusão de CTm no modelo PAN	72
5.3.2.a) Evolução ponderal	72
5.3.2.b) Pressão caudal	73
5.3.2.c) Proteinúria	75
5.3.2.d) Albuminúria	77
5.3.2.e) Função renal avaliada pela uréia e creatinina sérica	79
5.3.2.f) Glomeruloesclerose	80
5.3.2.g) Fibrose Intersticial	82
5.3.2.h) Imunohistoquímica para identificação de miofibroblastos	84
5.3.2.i) Microscopia eletrônica	86
5.3.2.j) PCR em tempo real dos marcadores podocitários	89
5.3.2.l) Imunohistoquímica para identificação de podócitos	92
5.3.2.m) PCR em tempo real de citocinas	95
5.3.2.n) PCR em tempo real do VEGF	96
5.3.2.o) Imunohistoquímica para atividade de proliferação	98
5.3.2.p) Imunohistoquímica para identificação de macrófagos	99
5.3.2.q) Imunohistoquímica para identificação de linfócitos-T	100
5.4. Estudos <i>in vitro</i>	102
5.4.1. Isolamento e cultivo de glomérulos	102
5.4.2. Imunocitoquímica de glomérulos	103
5.4.3. Cocultura CTm e glomérulos	104
5.4.3.a) Cocultura por 10 dias	104
5.4.3.b) Cocultura por 14 dias	106
5.4.4. Cultura de CTm com colágeno IV	108
5.4.4.a) Aspecto morfológico das células	108
5.4.4.b) Citometria de fluxo	109
5.4.4.c) Imunocitoquímica	111
5.4.4.d) PCR em tempo real dos marcadores podocitários	115
6. Resumo dos resultados	117
7. Discussão	119
8. Conclusão	139
9. Anexos	140
9.1. Anexo A	140
9.2. Anexo B	145
9.3. Anexo C	149
10. Referências	157

Lista de figuras

Figura 1.	Eletromicrografia da parede de um capilar glomerular	2
Figura 2.	A fenda diafragmática e seus três domínios	3
Figura 3.	Ilustração da anatomia molecular do podócito, representando as principais proteínas expressas nessa célula	10
Figura 4.	Caracterização dos grupos durante o estudo	39
Figura 5.	Desenho e protocolo do estudo	39
Figura 6A.	Fórmula utilizada para mensuração da largura média dos pedicelos	53
Figura 6B.	Fotografia de pedicelos em aumento de 15.000x	53
Figura 7.	Protocolos 1 e 2 da cocultura de CTm e glomérulos, com os respectivos dias dos experimentos	60
Figura 8	Protocolo de cultura com CTm e colágeno IV, com a realização dos experimentos após 7 dias	61
Figura 9	Fotos de cultura das CT extraídas da MO	65
Figura 10	Caracterização celular de marcadores de superfície por citometria de fluxo.....	66
Figura 11	Imagens das CTm após estímulo para diferenciação em células de linhagem osteogênica	67
Figura 12	Imagens das CTm após estímulo para diferenciação em células de linhagem adipogênica	68
Figura 13	Inoculação de CTm sob a cápsula renal.....	69
Figura 14	Imunofluorescência das CTm marcadas com CM-Dil	70
Figura 15	Localização e distribuição das CTm no tecido renal.....	71
Figura 16	Evolução ponderal dos animais durante o período do experimento	72
Figura 17	Pressão caudal dos animais ao longo do período experimental	74
Figura 18.	Proteinúria dos animais ao longo do período experimental	75
Figura 19.	Albuminúria dos animais no decorrer do experimento	77
Figura 20.	Aspecto dos glomérulos nos diferentes grupos aos 30 e 60 dias.....	80
Figura 21.	Gráfico da porcentagem de glomeruloesclerose	81
Figura 22.	Aspecto da fibrose intersticial no rim dos animais com 30 e 60 dias.....	82

Figura 23.	Gráfico da área de fibrose intersticial nos grupos estudados	83
Figura 24.	Expressão de α -actina através de imunohistoquímica nos diferentes grupos	84
Figura 25.	Quantificação da α -actina em cada grupo nos dias 30 e 60.....	85
Figura 26.	Imagens da microscopia eletrônica nos diferentes grupos com 60 dias.....	87
Figura 27.	Medida da espessura do pedicelo em cada grupo nos dias 30 e 60.....	88
Figura 28.	Representação gráfica da expressão de RNAm dos marcadores podocitários	90
Figura 29.	Expressão de WT1 através de imunohistoquímica nos diferentes grupos	92
Figura 30.	Porcentagem de área marcada da expressão de WT1 em cada grupo com 30 e 60 dias.....	93
Figura 31.	Expressão de nefrina através de imunohistoquímica nos diferentes grupos	94
Figura 32.	Expressão de nefrina através de imunohistoquímica nos diferentes grupos	94
Figura 33.	Representação gráfica da expressão de RNAm das citocinas inflamatórias.....	95
Figura 34.	Representação gráfica da expressão de mRNA do VEGF	96
Figura 35.	Expressão de PCNA através de imunohistoquímica nos diferentes grupos	98
Figura 36.	Expressão de ED1 através de imunohistoquímica nos diferentes grupos	99
Figura 37.	Expressão de CD43 através de imunohistoquímica nos diferentes grupos	100
Figura 38.	Aspecto dos glomérulos em cultura	102
Figura 39.	Aspecto da imunocitoquímica dos glomérulos.....	103
Figura 40.	Fotos representativas da cocultura de CTm e glomérulos até 10 dias.....	104
Figura 41.	Fotos representativas da cocultura de CTm e Glomérulos após 14 dias	106
Figura 42.	Aspecto morfológico das CTm cultivadas sem e com colágeno IV	108
Figura 43.	Histograma dos marcadores de superfície celular das CTm cultivadas sem e com colágeno IV.....	110
Figura 44.	Imunocitoquímica do marcador podocitário WT1	111

Figura 45. Imunocitoquímica da proteína de fenda diafragmática Nefrina.....	112
Figura 46. Imunocitoquímica da proteína de fenda diafragmática Podocina	113
Figura 47. Imunocitoquímica da proteína podocitária Sinaptopodina	114
Figura 48. PCR em tempo real dos marcadores podocitários.....	115

Lista de tabelas

Tabela 1.	Anticorpos utilizados para caracterização das células isoladas da medula óssea como CTm	34
Tabela 2.	Primers utilizados para PCR em tempo real	56
Tabela 3.	Peso dos animais durante o período do experimento.....	73
Tabela 4.	Pressão caudal dos animais ao longo do período experimental	74
Tabela 5.	Proteinúria dos animais ao longo do período experimental.	76
Tabela 6.	Valores da albuminúria dos animais durante o experimento	78
Tabela 7.	Valores de uréia e creatinina sérica durante o período do estudo	79
Tabela 8.	Valores da quantificação de glomeruloesclerose, fibrose intersticial e da expressão de α -actina.....	81
Tabela 9.	Valores da medida da espessura do pedicelo	88
Tabela 10.	Valores da expressão relativa de RNAm dos marcadores podocitários.....	91
Tabela 11.	Valores da expressão de WT1 nos grupos experimentais.....	93
Tabela 12.	Valores da expressão relativa de RNAm das citocinas inflamatórias e do VEGF	97
Tabela 13.	Valores da expressão de PCNA, ED1 e CD43 obtidos através de imunohistoquímica.....	101
Tabela 14.	Painel dos marcadores de superfície celular em CTm e CTm + glomérulos até 10 dias	105
Tabela 15.	Painel dos marcadores de superfície celular em CTm e CTm+glomérulos até 14 dias	107
Tabela 16.	Painel dos marcadores de superfície celular em CTm e CTm + colágeno IV	109
Tabela 17.	Valor da expressão relativa de RNAm dos marcadores podocitários na cultura de Ctm e CTm+colágeno IV	116

Lista de siglas

cDNA	Síntese do DNA complementar
CT	Células Tronco
CTe	Células Tronco embrionárias
CTh	Células Tronco hematopoiéticas
CTm	Células Tronco mesenquimais
CTs	Cycles threshold
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	Meio de Eagle modificado
DRC	Doença renal crônica
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EV	Via endovenosa
EUA	Estados Unidos da América
FD	Fenda diafragmática
FGF-4	Fator de crescimento do fibroblasto-4
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GESF	Glomeruloesclerose segmentar e focal
GLEPP-1	Proteína glomerular epitelial-1
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IP	Via intraperitoneal
MBG	Membrana basal glomerular
MO	Medula óssea
PAN	Aminonucleosídeo de puromicina
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Ficoeritrina
Pe-Cy.5	Ficoeritrina-Cy.5
PMAT	Plasma membrane monoamine transporter
SA-HRP	Estreptavidina conjugada com peroxidase

SCr	Creatinina sérica
SFB	Soro fetal bovino
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WT1	Gene do tumor de Wilms 1

Lista de símbolos

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
céls	Células
cm ²	Centímetros quadrados
dl	Decilitro
g	Aceleração da gravidade
G	Gauge
Hg	Mercúrio
Kg	Kilogramas
L	Litro
μL	Microlitro
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
M	Molar
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
°C	Graus celsius
pH	Potencial hidrogênico
RPM	Rotações por minuto
vs	Versus
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

RESUMO

Ramalho, RJ. Infusão de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea em modelo experimental de nefropatia crônica induzida por lesão de podócitos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Estudos com células tronco (CT) têm despertado grande interesse devido ao seu promissor potencial terapêutico. Neste contexto, as CT mesenquimais (CTm) representam uma alternativa para o tratamento de diversas patologias em diferentes órgãos, inclusive o rim e as glomerulopatias que o acometem. As doenças glomerulares constituem uma freqüente causa de doença renal crônica e se caracterizam por apresentar proteinúria. Neste processo, os podócitos são células que apresentam um papel crucial, sendo que as podocitopatias se associam com o aparecimento de proteinúria e desenvolvimento de esclerose glomerular. A obtenção de um modelo de podocitopatia através da administração de aminonucleosídeo de puromicina (PAN), permite a melhor compreensão dessas células altamente diferenciadas que não possuem potencial de proliferação ou regeneração. O presente projeto teve como objetivo estabelecer o modelo experimental de nefropatia crônica induzida por PAN associado à nefrectomia unilateral (UniNx) para induzir lesões glomerulares mais exuberantes e, neste modelo experimental, avaliar o efeito da infusão de CTm derivadas da medula óssea. Ratos Wistar (n=52) foram divididos em três grupos: **Controle** (UniNx), **PAN** (PAN+UniNx) e **PAN+CTm** (PAN+UniNx+CTm). As CTm foram inoculadas na região subcapsular renal no dia 0 e os animais foram sacrificados após 30 e 60 dias. O efeito da infusão das CTm no tecido renal foi avaliado através de parâmetros clínicos e laboratoriais, além de análise histológica, imunohistoquímica, microscopia eletrônica e PCR em tempo real. Paralelamente, o projeto analisou a diferenciação *in vitro* de CTm em podócitos através do estímulo com colágeno tipo IV e através de cocultura de glomérulos isolados de ratos com CTm. A diferenciação celular das CTm foi analisada por citometria de fluxo, imunocitoquímica e PCR em tempo real para genes de proteínas podocitárias. No modelo *in vivo* foi possível observar a presença de CTm até 15 dias após a inoculação na região subcapsular renal. As CTm foram capazes de diminuir significativamente a proteinúria e a albuminúria com 30 e 60 dias, assim como a pressão arterial aos 60 dias. Não houve diferença nos valores de creatinina, uréia sérica, glomeruloesclerose e fibrose intersticial entre o grupo PAN e o grupo

PAN+CTm. As CTm foram responsáveis pela diminuição significativa da fusão dos pedicelos à microscopia eletrônica, com melhora da expressão relativa de WT1 aos 60 dias e melhora parcial da expressão gênica de nefrina, podocina e sinaptopodina. A expressão proteica de WT1 também foi significativamente maior no grupo PAN+CTm em comparação ao grupo PAN. Além disso, houve melhora significativa da expressão relativa de IL-4 e IL-10, e diminuição de IL-1 β e TNF- α no grupo tratado. Ainda, as CTm promoveram aumento significativo da expressão gênica de VEGF aos 60 dias. Nos resultados *in vitro* não houve diferenciação das CTm em podócitos quando cultivadas com colágeno IV, assim como a cocultura com glomérulos não proporcionou alteração na expressão de marcadores de superfície das CTm. Concluímos que a terapia celular com CTm foi capaz de induzir proteção renal caracterizada por diminuição da proteinúria, da albuminúria e da pressão arterial, associado a menor fusão dos pedicelos, maior expressão gênica de proteínas podocitárias e de expressão celular de WT1. As citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10, em conjunto com o VEGF, foram os possíveis mediadores responsáveis por estes resultados.

Descritores: 1. Células-Tronco; 2.Células-Tronco Mesenquimais; 3. Podócitos; 4. Proteinúria; 5. Puromicina.

SUMMARY

Ramalho, RJ. Infusion of bone marrow mesenchymal stem cells in an experimental model of chronic nephropathy induced by podocyte injury [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Stem cells (SC) have emerged as a potential therapeutic approach for several diseases. In this context, the mesenchymal SC (mSC) are considered an alternative for the treatment of kidney diseases such as glomerulopathies. Glomerular diseases are an important cause of chronic kidney disease (CKD) and are characterized by proteinuria. In this process, the podocytes are cells that have a critical role, and the podocytopathies are associated with the onset of proteinuria and glomerular sclerosis. The achievement of a podocytopathy model through administration of puromycin (PAN) allows a better understanding of these highly differentiated cells which do not have the potential for proliferation or regeneration. The aim of the present study was to establish an experimental model of chronic nephropathy induced by PAN associated with unilateral nephrectomy (UniNx), to induce early and marked glomerular lesions and, in this experimental model, to evaluate the effect of bone marrow mSC infusion. Wistar rats (n=52) were randomly divided into three groups: **Control** (UniNx), **PAN** (PAN+UniNx) and **PAN+mSC** (PAN+UniNx+mSC). mSC were inoculated into the subcapsular renal region on day 0, and the animals were sacrificed after 30 and 60 days. The mSC infusion effects in renal tissue were evaluated by clinical and laboratory parameters, histology, immunohistochemistry, electron microscopy and real-time PCR. In parallel, we analyzed whether mSC could differentiate *in vitro* into podocytes through stimulation with collagen type IV or by means of co-culture of isolated rat glomeruli with mSC. The cell differentiation was analyzed by flow cytometry, immunocytochemistry and real-time PCR. In the *in vivo* model, mSC were detected until 15 days after inoculation in the renal subcapsular region. mSC were able to significantly reduce the proteinuria and albuminuria with 30 and 60 days, as well as blood pressure at 60 days. There was no difference in the values of creatinine, BUN, glomerulosclerosis and interstitial fibrosis between the groups PAN and PAN+mSC. The treated group showed lower effacement of foot process by electron microscopy, with significant improvement in the relative expression of WT1 in 60 days and partial improvement of nephrin, podocyn and synaptopodin. The WT1 protein expression was also significantly higher in the PAN+mSC group compared to the PAN group. In addition, mSC

treatment significantly reduced gene expression of IL-1 β and TNF- α , as well as increased the expression of IL-4 and IL-10. At 60 days mSC promoted significant increase of VEGF relative expression. *In vitro* results, mSC cultivated with collagen type IV did not show differentiation to podocytes and the co-culture with glomeruli provided no change in expression of mSC surface markers. In conclusion, mSC therapy in the PAN model was able to induce renal protection characterized by the reduction of albuminuria, proteinuria and blood pressure, associated with a lower effacement of foot process, increased gene expression of podocytes proteins and cellular expression of WT1. Inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-4 and IL-10 associated with VEGF were the probable mediators of these results, promoting podocyte protection.

Descriptors: 1. Stem Cells; 2. Mesenchymal Stem Cells; 3. Podocytes; 4. Proteinuria; 5. Puromycin.

1. INTRODUÇÃO

As glomerulopatias constituem uma importante causa de doença renal crônica (DRC). Segundo dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia coletados através do Censo 2011, as doenças de origem glomerular constituem a 3ª causa de terapia renal substitutiva no Brasil, com 11,4% dos casos, atrás somente de diabetes e hipertensão arterial (Sesso et al, 2012).

Uma grande parte das glomerulopatias evolui progressivamente para DRC terminal. Na maioria dos casos, as glomerulopatias se manifestam clinicamente por proteinúria, decorrente de alterações na barreira de filtração glomerular.

1.1. Barreira de filtração

A barreira de filtração glomerular é uma estrutura trilaminar formada pelo endotélio glomerular fenestrado, pela membrana basal glomerular (MBG) e pela camada epitelial composta pelos podócitos (Tryggvason et al, 2003). A camada endotelial é fenestrada e possui sítios aniônicos presentes no glicocálice que repelem as proteínas plasmáticas. A MBG possui a propriedade de filtrar proteínas selecionando-as por tamanho e carga elétrica e é composta por uma variedade de proteínas incluindo: colágeno tipo IV, proteoglicanos de heparan sulfato, laminina, entre outras (Pavenstadt et al,

2003). Completando essa barreira, os podócitos desempenham o principal papel na fisiopatologia glomerular (**Figura 1**).

Figura 1. Eletromicrografia da parede de um capilar glomerular caracterizado pelo espaço de Bowman (**EB**), podócitos (**P**), membrana basal glomerular (**MBG**) e endotélio (**END**). Aumento de 60.000X. *Adaptado de Akhtar et al, 2004.*

1.1.1. Podócitos

Na última década, o conhecimento sobre a estrutura e função destas células epiteliais teve avanços importantes, tornando-se evidente que o podócito desempenha um papel chave na patogênese da proteinúria. Podócitos são células altamente diferenciadas com uma arquitetura única, sendo sua estrutura composta pelo corpo celular, processos principais e pedicelos (Mundel et al, 1995). Eles se desenvolvem fora do blastema nefrogênico durante o desenvolvimento do glomérulo e são as primeiras células a serem distinguidas, formando uma camada de células epiteliais em formato discóide. Posteriormente, durante o processo de maturação, que está associado com a perda de pluripotência e capacidade de proliferação, os

podócitos desenvolvem seus característicos processos interdigitais denominados pedicelos, que são importantes para a formação dos primeiros contatos célula-célula. Os pedicelos formam poros de cerca de 40 nm de largura, os quais são cobertos por uma estrutura de membrana extracelular parecida com um zíper, chamada fenda diafragmática (Pavenstadt et al, 2003).

O citoesqueleto dos pedicelos, que é a base da arquitetura celular, é predominantemente formado por microfilamentos de actina, resultando em uma sólida e dinâmica estrutura. Todos os três domínios do pedicelo são física e funcionalmente ligados ao citoesqueleto de actina: o domínio da membrana apical, a fenda diafragmática (FD) e o domínio da membrana basal (**Figura 2**).

Figura 2. A fenda diafragmática (**FD**) está inserida lateralmente na membrana celular do podócito. Três domínios estão marcados: o apical, em verde, acima da fenda diafragmática; o da membrana da fenda diafragmática, marcada em azul; e o basal, marcado em vermelho, que representa a base dos pedicelos (aumento de 140.000X) (*adaptado de Kerjaschki, 2001*).

Nos últimos anos, houve grande avanço no conhecimento da estrutura, das bases moleculares e das mais de 140 proteínas podocitárias identificadas

até o momento (Pierchala et al, 2010), sendo as mais importantes detalhadas a seguir.

Fator de Crescimento Vascular Endotelial: O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é importante no controle da angiogênese e da permeabilidade vascular. O VEGF no rim é expresso predominantemente nos podócitos, mas também nas células do túbulo proximal, distal e coletor. Foi demonstrado em camundongos com deleção dos dois alelos do VEGF podocitário que esses animais apresentavam alta letalidade perinatal e insuficiência renal, sendo sua presença indispensável para o desenvolvimento glomerular. A deleção de um só alelo além de propiciar endoteliose, promoveu proteinúria e glomeruloesclerose, com progressão para insuficiência renal (Eremina et al, 2003). Além disso, experimentos com cultura de podócitos demonstraram que o VEGF exerce tanto efeitos parácrinos quanto autócrinos, regulando outras proteínas podocitárias como a podocina e o CD2AP (Guan et al, 2006). Outro estudo, utilizando um inibidor de VEGF, acelerou o aparecimento de proteinúria, glomeruloesclerose e fibrose intersticial em um modelo de glomerulopatia com crescentes, associado a uma diminuição da proteína nefrina (Hana et al, 2006). Todos estes achados suportam a importância do VEGF na regulação e manutenção dos podócitos.

Sinaptopodina: A sinaptopodina é outra proteína que contribui na manutenção da forma do citoesqueleto, pois mantém a estabilidade dos filamentos de actina e ajuda na motilidade dos pedicelos (Greka et al, 2012).

Recentemente, foi descrito que alterações na regulação do cálcio e a subsequente ativação de calcineurina foram suficientes para proporcionar degradação de sinaptopodina e proteinúria *in vivo*. A utilização da ciclosporina previne a degradação *in vitro* desta proteína, assim como diminui a proteinúria em modelo experimental de lesão renal induzida com lipopolissacarídeo em camundongos, provando um efeito direto da ciclosporina sobre os podócitos, independente da sua ação imunossupressora (Faul et al, 2008). Estas informações sugerem que a sinaptopodina, além de ser um marcador de podócitos diferenciados, também é crucial para manter sua integridade.

WT1: O gene do tumor de Wilms 1 (WT1) é identificado como um gene supressor deste tumor, que acomete principalmente crianças jovens. Desde a identificação deste gene tem sido claramente demonstrado que a proteína WT1 tem um papel essencial no desenvolvimento urogenital e, ao sofrer alterações na sua expressão, propicia algumas patologias congênitas e adquiridas (Pavenstadt et al, 2003). Células precursoras de podócitos e estágios subsequentes expressam abundantemente esta proteína, tornando-a um marcador de podócitos (Mundel et al, 1997). Assim, o WT1 é um componente localizado no núcleo do podócito, sendo expresso tanto em podócitos maduros quanto imaturos, com papel na regulação da nefrogênese, na indução e manutenção da transição epitélio-mesenquimal durante a glomerulogênese e manutenção do fenótipo maduro do podócito (Roberts, 2005).

1.1.2. Proteínas do domínio da membrana apical

Podocalixina: esta proteína encontrada na membrana apical dos pedicelos também é expressa em outros órgãos, como no sistema hematopoiético, e em algumas neoplasias hepáticas, mamárias, testiculares e leucemias (Nielsen et al, 2009). Sua ausência, como obtido em camundongos geneticamente modificados para não expressarem a podocalixina, torna os animais anúricos e com total letalidade ao nascimento, demonstrando sua participação ativa na nefrogênese (Doyonnas et al, 2001). No rim, sua principal função é manter os espaços entre os pedicelos através de repulsão por cargas elétricas, tendo papel na adesão celular e manutenção da morfologia, sendo o domínio extracelular desta proteína o principal responsável por essas características (Nielsen et al, 2009).

GLEPP-1: A proteína glomerular epitelial 1 (GLEPP-1) é encontrada neste domínio, localizada na superfície dos pedicelos (Wiggins et al, 1995). Camundongos com deficiência desta proteína apresentam morfologia podocitária alterada na microscopia eletrônica, e embora não apresentem proteinúria, manifestam redução na filtração glomerular e pressão arterial elevada (Wharram et al, 2000). Assim, a GLEPP1 parece ser essencial para a regulação da filtração glomerular e manutenção da estrutura dos pedicelos, mas são necessários mais estudos para melhor correlacioná-la com as outras proteínas dos podócitos.

1.1.3. Proteínas da fenda diafragmática

A FD é a estrutura central para a função de barreira do glomérulo. Recentemente, diversas pesquisas têm proporcionado maiores conhecimentos sobre a estrutura molecular e seu papel na filtração glomerular. Estas pesquisas têm permitido a descoberta de várias proteínas que interagem com os pedicelos e com a FD, sendo assim responsáveis pela integridade da estrutura podocitária, e conseqüente funcionamento adequado da barreira de filtração.

Nefrina: Em 1998, foi demonstrado que o produto do gene NPHS-1, chamado nefrina, tem um papel crucial na manutenção da barreira de filtração glomerular (Kestila et al, 1998). Posteriormente, outro estudo comprovou que ela está localizada especificamente na FD, sendo o seu principal componente (Ruotsalainen et al, 1999). A nefrina é uma proteína transmembrana com uma porção extracelular (formada pelo domínio N-terminal, um domínio de imunoglobulinas e outro de fibronectina), uma porção transmembrana e uma porção citoplasmática (formada pelo domínio C-terminal). A porção extracelular da nefrina possui dois resíduos de cisteína através dos quais se prende à molécula de nefrina da molécula adjacente através de pontes dissulfeto (Tryggvason et al, 2001). A diminuição na expressão da nefrina está relacionada com o desenvolvimento de proteinúria em algumas glomerulopatias, como a síndrome nefrótica finlandesa, lesões mínimas, glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) (Tryggvason et al, 2006; Furness et al, 1999) e em diversos modelos experimentais: puromicina (Dunér et al, 2010), adriamicina (Nakhoul et al, 2005), entre outros.

CD2AP: CD2AP é um adaptador que liga proteínas de membrana ao citoesqueleto de actina. No rim, ela é principalmente expressa em podócitos, mas é encontrada também em células dos ductos coletores e algumas células tubulares proximais (Li et al, 2000). Esta proteína está localizada na FD, no lado citoplasmático dos podócitos, e interage com o domínio intracelular da nefrina (Yuan et al, 2002). A importância desta proteína para a filtração glomerular foi demonstrada em experimentos com animais *knockout* para o gene da CD2AP, os quais desenvolveram síndrome nefrótica caracterizada pela fusão dos pedicelos, proteinúria, aumento de matriz mesangial e glomerulosclerose (Li et al, 2000). Estes dados sugerem que CD2AP pode ter um papel importante na manutenção normal da barreira de filtração, possivelmente através da sua interação com a nefrina e com outras proteínas podocitárias.

Podocina: Pertence a uma família de proteínas cujo gene codificador é o NPHS2, sendo que mutações neste gene proporcionam síndrome nefrótica autossômica recessiva, caracterizada principalmente pela resistência aos corticosteróides (Pavenstadt et al, 2003). Ela se localiza no sítio da inserção da FD, interligando a porção citoplasmática da nefrina e a proteína CD2AP, participando na regulação da integridade desta estrutura (Roselli et al, 2002)

P-caderina: P-caderina é uma proteína transmembrana que pertence a uma família de adesão célula-célula, cujas propriedades são cálcio dependentes. É formada por cinco domínios de caderinas na sua porção extracelular e uma β -catenina que se liga ao sítio em sua porção citoplasmática, através da

qual a molécula é ligada ao citoesqueleto de actina (Gumbiner, 1996). Foi demonstrado *in vitro*, utilizando-se cultura de podócitos e indução de podocitopatia diabética, que essas células apresentaram diminuição da p-caderina, sendo assim também um importante constituinte da FD (Herman-Edelstein et al, 2011).

1.1.4. Proteínas do domínio da membrana basal

$\alpha1\beta3$ integrina: são moléculas transmembranas localizadas na membrana basal do pedicelo, e se ligam em alguns componentes da MBG, como as cadeias $\alpha3$, $\alpha4$ e $\alpha5$ do colágeno IV, fibronectina e laminina. Essas ligações agregam integrinas visando à estabilização do pedicelo, assim como recrutam proteínas do citoesqueleto podocitário, mantendo a morfologia e funcionalidade desta célula (Kreidberg et al, 2000).

Distroglicana: essa proteína consiste de duas subunidades, uma subunidade α extracelular que se liga a componentes da MBG, como a laminina, e uma subunidade β transmembrana. Recentemente foi demonstrado que, ao contrário das evidências até então conhecidas, camundongos que não expressavam distroglicana nos podócitos mantinham a morfologia dos pedicelos, assim como não apresentavam maior proteinúria quando expostos a drogas nefrotóxicas, provando que esta proteína não é essencial na fisiopatologia podocitária (Jarad et al, 2011).

Figura 3. Ilustração da anatomia molecular do podócito representando as principais proteínas expressas nessa célula (*adaptado de Kerjaschki, 2001*)

1.1.5. Podocitopatias

As doenças glomerulares caracterizadas por síndrome nefrótica, ou seja, com proteinúria maior que 3,5 gramas em 24 horas, hipoalbuminemia, edema generalizado e hipercolesterolemia, podem ser consideradas como consequência de disfunção podocitária causada por fatores genéticos e/ou

ambientais. O fenótipo clínico desenvolvido depende do momento em que tais fatores atuam, assim como o tempo e intensidade da agressão glomerular, prevalecendo as causas idiopáticas. As síndromes clínicas associadas com disfunção podocitária são denominadas podocitopatias e são as seguintes: doença de lesões mínimas, glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF), glomerulopatia colapsante idiopática e esclerose mesangial difusa (Barisoni et al, 2007).

Cada uma das síndromes tem um fenótipo podocitário diferente. Na doença de lesões mínimas a lesão podocitária é limitada à fusão dos pedicelos e o número de podócitos permanece normal, sendo reversível na maior parte das vezes. Na GESF, uma forma mais grave de lesão podocitária pode ocorrer, com descolamento e morte dessas células, e consequentemente diminuição do número de podócitos. Estes eventos iniciam uma cascata de lesões que culminam com sinéquias segmentares, características da GESF. Além disso, podócitos lesados podem se desdiferenciar e reiniciar seu ciclo celular, evoluindo com altas taxas de proliferação e provocando o colapso de alças capilares glomerulares, caracterizando a glomerulopatia colapsante idiopática. E por fim, a esclerose mesangial difusa se caracteriza por hipertrofia dos podócitos e moderada hiperplasia dessas células, com pouca atividade proliferativa (Barisoni et al, 2007).

A doença glomerular mais prevalente em nosso meio é a GESF. O registro paulista de glomerulopatias, com 1.844 pacientes, aponta a prevalência de GESF em 29,7% das biópsias renais (Malafronte et al, 2006). Outro registro

brasileiro, com 9.617 biópsias, também mostra a GESF como a glomerulopatia primária de maior prevalência, com 24,6% de casos (Polito et al, 2010).

A proteinúria é considerada um importante marcador de doença renal e também um fator de risco independente para a progressão da falência renal (Taal et al, 2008; Tryggvason et al, 2003). A taxa de proteinúria está intimamente ligada ao declínio da função renal na maioria das doenças glomerulares primárias e secundárias. Por este motivo é de grande interesse o estudo de mecanismos e de alternativas terapêuticas que possam diminuir a proteinúria e bloquear a progressão da nefropatia. Diversos estudos demonstraram o efeito benéfico do uso de inibidores da enzima de conversão e/ou de bloqueadores de angiotensina II (Praga et al, 1992; Li et al, 2006), e de imunossupressores como corticosteróides, ciclosporina e micofenolato mofetil (Banfi et al, 1991; Cattran et al, 1999; Fujihara et al, 2000) reduzindo a proteinúria e atenuando a progressão da doença renal. Apesar das alternativas terapêuticas serem de grande importância, nenhuma delas demonstrou ser realmente efetiva em longo prazo.

1.2. Modelo experimental de nefropatia crônica induzido por aminonucleosídeo de puromicina (PAN)

A utilização de modelos experimentais permite uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão das doenças renais e, desta forma, tem possibilitado a investigação de estratégias terapêuticas. O modelo PAN é um modelo experimental bem estabelecido induzido através da administração de aminonucleosídeo de puromicina (PAN) que causa dano glomerular, através da redução do número de podócitos, resultando em proteinúria e consequente glomeruloesclerose e doença renal crônica (Anderson et al, 1988; Diamond et al, 1986; Ricardo et al, 1994, Someya et al, 2005). A PAN é um antibiótico sintetizado a partir do *Streptomyces alboniger*, cuja primeira referência data de 1952 (Yarmolinsky et al, 1958).

O mecanismo exato envolvido na lesão glomerular do modelo PAN ainda não foi elucidado. Sabe-se que a puromicina é um inibidor da síntese *de novo* de proteínas, com capacidade de inibir a síntese de ácidos nucléicos nas células epiteliais glomerulares (Shiiki et al, 1998; Fishman et al, 1985). A lesão podocitária induzida pela puromicina acontece via produção de espécies reativas de oxigênio, com desprendimento dos pedicelos da membrana basal glomerular, com subsequente apoptose dos podócitos, propiciando o aparecimento de alterações glomerulares similares a lesões mínimas e GESF (Kim et al, 2000; Diamond et al, 1986; Marshall et al, 2006; Shah et al, 1989; Kashinath et al, 1988).

Experimentos com cultura de podócitos demonstraram que a apoptose induzida pela PAN ocorre através de *upregulation* do p53, uma proteína citoplasmática pró-apoptótica. Os mesmos autores demonstraram que o p53 regula duas proteínas com papéis distintos. Uma delas denominada Bax, que tem efeito pró-apoptótico e a outra chamada Bcl-xL, com ação anti-apoptótica. A PAN, portanto, promove um desbalanço destas proteínas, com aumento da Bax e diminuição da Bcl-xL (Wada et al, 2005).

Recentemente, foi descrito um novo transportador de cátions orgânicos denominado *plasma membrane monoamine transporter* (PMAT). Ele é responsável por transportar nucleosídeos de purina, sendo a PAN um análogo destes nucleosídeos. Descobriu-se que no tecido renal de ratos, e somente nos podócitos, há receptores específicos para o PMAT, justificando a podocitopatia induzida por esta droga. Além disso, utilizando células tubulares, foi demonstrado *in vitro* que quando transfectadas com PMAT e expostas a PAN, estas células apresentam menor viabilidade (Xia et al, 2009).

A doença renal induzida por PAN apresenta diferentes manifestações dependendo da dose, frequência, via de administração, sexo e linhagem de roedores utilizada. A via de inoculação mais utilizada é a via endovenosa (via caudal), porém há inúmeros experimentos descrevendo vias de inoculações alternativas, como subcutânea e intraperitoneal, alcançando o efeito proteinúrico desejado. A dose mais comumente utilizada é 150 mg/kg, mas há variação na literatura entre 50 mg/kg e 180 mg/kg, podendo ser

aplicada uma única vez, quando o objetivo é desenvolver o modelo de lesões mínimas, ou repetidas vezes a fim de propiciar o aparecimento de lesões do tipo GESF (Pippin et al, 2009). As linhagens mais utilizadas são Wistar, Sprague-Dowley e Munich-Wistar, com o início e pico da proteinúria diferindo entre elas. A combinação da administração de PAN com a realização de nefrectomia unilateral (UniNx) acelera o processo de obtenção da lesão glomerular (Glasser et al, 1977).

1.3. Células Tronco

As células tronco (CT) são células indiferenciadas, que possuem três características básicas: a capacidade de auto-replicação por um longo período, a habilidade de diferenciar-se em diferentes linhagens celulares, incluindo células maduras funcionais, e capacidade de reconstituir, in vivo, um tecido lesado (Preston et al, 2003; Rippon et al, 2004). As CT apresentam diferentes potenciais de diferenciação e são classificadas de acordo com esta capacidade em células totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes.

As células totipotentes são consideradas as células mestras do corpo, capazes de formar o embrião, a placenta e os anexos embrionários, gerando um novo indivíduo. São as células encontradas no zigoto e nos descendentes das suas duas primeiras divisões.

Após cerca de 4 a 5 dias, estas células totipotentes começam a especializar-se, formando o blastocisto, a partir do qual o embrião se desenvolve e vai dar origem ao feto. Células no interior do blastocisto são consideradas as CT embrionárias (CTe): são células pluripotentes, capazes de se diferenciar nos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma), mas são incapazes de dar origem a um embrião ou à placenta, e, portanto, são incapazes de originar um novo indivíduo.

A maioria dos tecidos adultos tem CT multipotentes, células capazes de produzir uma limitada variedade/espectro/faixa/ de linhagens de células diferenciadas adequadas à sua localização. As CT unipotentes são as células capazes de gerar um único tipo celular.

A capacidade das CT em adotar um perfil de expressão gênica, funcional e fenotípico de outros tipos celulares, é denominado plasticidade. Assim, CT derivadas da medula óssea (MO), podem, por exemplo, dar origem a hepatócitos (Alison et al, 2000), células musculares (Gussoni et al, 1999), cardiomiócitos (Makino et al, 1999), células neuronais (Brazelton et al, 2000), entre outras.

Ainda, as CT podem ser classificadas de acordo com sua origem em CT embrionárias e CT adultas.

As CTe são derivadas de embriões no estágio de blastocisto e são pluripotentes. Expressam marcadores celulares específicos, tais como SSEA-3 e 4 (*stage specific embryonic antigen*) e TRA-1-60 (*tumor rejection antigen*) e também marcadores intracelulares (fatores de transcrição) tais

como: OCT-4 (*octamer-binding transcription factor*), Nanog, SOX-2 e Rex-1. Existem duas características que tornam essas células mais atrativas. Primeiro, é a característica de poder gerar quase todos os tipos celulares e segundo é o fato destas células poderem ser expandidas indefinidamente devido ao seu alto nível de expressão da telomerase, o que explica sua capacidade de manter ilimitada autorenovação (Hiyama et al, 2007). Apesar do potencial promissor das CT e para o tratamento de várias doenças, existem restrições no uso terapêutico, devido ao risco de rejeição imunológica e sobre conceitos éticos quanto à coleta e ao uso (Guam et al, 1999; Odorico et al 2001; Rippon et al 2008). Estes fatores têm proporcionado um direcionamento das pesquisas para as CT adultas.

Em adultos, há um grande espectro de CT que apresentam diferentes níveis de potencialidade. Uma das principais fontes de CT adultas é a MO, um tecido derivado do mesoderma, suportado por um microambiente de células do estroma encaixadas na matriz extracelular, e formado por um componente celular hematopoiético complexo (Gurkan et al, 2008). Estas CT adultas são multipotentes, capazes de gerar tipos celulares que compõem o tecido ou órgão específico onde estão situadas (Bjornson et al, 1999). Elas são divididas em CT hematopoiéticas (CTh) e CT mesenquimais (CTm).

As CTh são células capazes de originar todos os tipos de células sanguíneas e são encontradas na MO, no sangue periférico e no sangue de cordão umbilical. Uma desvantagem dessas células é que apresentam baixa taxa de proliferação. A caracterização das CTh é feita utilizando-se

marcadores de superfície, sendo o antígeno CD34 o principal marcador da população de CTh. Além do CD34, as CTh podem ser definidas como positivas para os marcadores CD11b, CD27, CD45, CD45RA^{low}, CD41, CD14, c-kit (CD117), Sca-1, CD133, e pela ausência ou baixa expressão de outros marcadores como lin- (ausência de marcadores linhagem-específicos), Thy-1^{low}, CD38, CD33, CD71 (Herrera et al, 2006a).

As CTm estão presentes no estroma da MO e por isso antigamente eram denominadas CT estromais. São células multipotentes que apresentam também a capacidade de se diferenciar em diversas linhagens celulares do tecido conjuntivo, incluindo osteócitos, condrócitos e adipócitos. Apresentam marcadores de superfície positivos para CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105; e negativos para CD34, CD45 e CD117. O grande interesse neste tipo celular se deve ao seu potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos lesados, pois quando em um microambiente específico, estas células são capazes de se diferenciar em uma gama variável de células, como as do coração, dos ossos, de cartilagem, do tecido conjuntivo e do tecido nervoso, podendo até mesmo regenerar os tecidos (Minguell et al, 2001; Meirelles et al 2003).

Até recentemente, acreditava-se que as CTm poderiam diferenciar-se apenas em linhagens específicas. No entanto, foi demonstrado que CT do estroma da MO possuem o potencial de diferenciar-se nas células dos três folhetos embrionários (Jiang et al, 2002). Estas células parecem possuir algumas propriedades das CTe por expressarem as mesmas proteínas

OCT-4, Rex-1 e SSEA-1, sendo as duas primeiras responsáveis por manter as CTe em estado indiferenciado (Gurkan et al, 2008).

Não se sabe até hoje quais são os mecanismos exatos envolvidos na diferenciação celular, mas acredita-se que um microambiente adequado proporcione a diferenciação em células desejadas. Por exemplo, adicionando-se fibronectina e VEGF numa cultura de CTm, esta se transforma em células endoteliais; já quando se acrescenta FGF-4 (fator de crescimento do fibroblasto-4) e HGF (fator de crescimento do hepatócito) as células adquirem características de hepatócito; e quando acrescentado fibronectina e bFGF (fator de crescimento de fibroblasto básico) as CTm, após quatorze dias, se diferenciam em células nervosas (astrócitos, oligodendrócitos e neurônios) (Verfaillie, 2002).

Além disso, as CTm podem ser consideradas CT imunoprivilegiadas, uma vez que apresentam baixa imunogenicidade e não causam rejeição alogênica em seres humanos. Estas células não expressam antígenos do grupo sanguíneo ABO-Rh, não expressam antígenos HLA de classe II, nem moléculas co-estimulatórias. Também apresentam funções imunomoduladoras que incluem a habilidade em suprimir a resposta imune mediada por células T e B, embora potencialmente menos eficazes *in vivo* do que *in vitro* (Pittenger et al, 1999). Esta propriedade imunossupressora das CTm humanas torna-as candidato importante para a terapia celular em configurações alogênicas.

Assim, nada mais natural que com tantas propriedades favoráveis à sua utilização, as CTm sejam alvo de intensa pesquisa nas mais diversas áreas a fim de possibilitar sua aplicação no tratamento de diferentes patologias.

1.4. Células Tronco e doenças renais

Pesquisas com terapia celular têm sido realizadas em inúmeros modelos de doenças renais, destacando-se modelos de insuficiência renal aguda, doença renal crônica e glomerulopatias. Morigi et al. demonstraram o papel renoprotetor das CTm em modelo de IRA induzido por cisplatina (Morigi et al, 2004). Outros experimentos, utilizando o modelo de isquemia/reperfusão, demonstraram que as CTm contribuíram para o aumento significativo da 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). Em um estudo clínico de Fase I com CTm em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com alto risco de desenvolver IRA, houve diminuição no tempo de internação e na taxa de readmissão, sendo que nenhum paciente necessitou de hemodiálise, enquanto aproximadamente 20% dos pacientes do grupo controle necessitaram de terapia renal substitutiva (Tögel et al, 2010).

Em modelos de lesão renal crônica o efeito benéfico das CT ainda não está claro. Dentre os poucos estudos publicados analisando o possível efeito de CT na DRC experimental, destaca-se o estudo de Li e colaboradores que avaliaram o efeito a longo prazo de CTm em modelo de glomerulonefrite

induzida por anti-Thy-1 associado à UniNx. Seus resultados demonstraram que as CT contribuíram no reparo e regeneração de células endoteliais e mesangiais imunomoduladoras (Li et al, 2006). Outro estudo observou que a administração de uma população celular de linhagem negativa (Lin⁻) em animais com DRC, apresentou uma melhora nos níveis de creatinina, uréia e proteinúria. Este efeito renoprotetor foi ainda mais significativo quando analisado no período de 120 dias após o tratamento, com melhora da função renal e da fibrose intersticial (Alexandre et al, 2009).

Recentemente, foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que o uso de CTm em modelo de nefropatia por ablação 5/6 bloqueou a progressão da doença renal. Foi constatado 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 (Cavaglieri et al, 2009). Resultados semelhantes foram descritos por outros grupos que também notaram uma marcante melhora da função renal (Caldas et al, 2008; Semedo et al 2009).

Em relação às glomerulopatias, uma das primeiras evidências sobre o papel de CT em doença renal experimental foi apresentado por Imasawa et al., que mostraram que ratos com nefropatia de IgA espontânea apresentaram melhora da doença após transplante de MO (Imasawa et al, 1999). A infusão de CTm também mostrou efeitos benéficos em modelo de glomerulonefrite

anti-Thy 1.1. Os animais que receberam CTm apresentaram menor mesangiólise, melhora da proliferação de células glomerulares e redução da proteinúria (Kunter et al, 2006). Também utilizando este modelo, outros estudos demonstraram que células progenitoras endoteliais derivadas da MO contribuem para a recuperação do endotélio glomerular (Rookmaaker et al, 2003; Ikarasaki et al, 2005; Ushimura et al, 2005). Por outro lado, em modelo de doença de Alport, utilizando camundongos COL4A3 *-/-*, não houve maior sobrevida ou menor progressão da doença com a infusão de CTm, embora a fibrose intersticial tenha diminuído (Ninichuk et al, 2006). Em outro estudo com o mesmo modelo, células embrionárias de camundongo foram capazes de promover novamente a expressão da cadeia alfa 3 do colágeno IV (LeBleu et al, 2009).

1.5. Diferenciação de Células Tronco em podócitos

Os mecanismos envolvidos na diferenciação de CT em podócitos ainda não foram completamente elucidados. Poulsom et al. transplantaram CT de ratos machos em ratos fêmeas e demonstraram, através da hibridização *in situ*, que células contendo o cromossomo Y foram observadas no glomérulo renal, com morfologia e localização compatível com podócitos (Poulsom et al, 2001).

Outro trabalho realizado por um grupo do Canadá demonstrou *in vitro* que com a utilização do hexâmero NC1 do colágeno tipo IV, CTm adquiriam

características de podócitos, ou seja, apresentavam proteínas como sinaptopodina, alfa-actina e CD2AP. Apesar das CTm terem adquirido características de podócitos, estas células ainda não estão totalmente diferenciadas, pois não expressam proteínas encontradas em podócitos “maduros”, como por exemplo, a podocina (Perry et al, 2006).

Ronconi et al demonstraram que células renais progenitoras localizadas no epitélio parietal da cápsula de Bowman, de humanos, podem regenerar podócitos. Tanto *in vitro* como *in vivo*, as células progenitoras CD133+CD24+ expressaram marcadores podocitários, mais especificamente na região do pólo vascular da cápsula de Bowman (Ronconi et al, 2009).

Recentemente, pesquisadores australianos utilizaram células tronco de pluripotência induzida, originárias de células mesangiais de rim humano normal, e através de estímulo com meio de cultura adequado, após 10 dias, observaram que essas células se diferenciaram em podócitos, comprovado através de imunofluorescência para WT1, PAX2, nefrina, podocina e sinaptopodina. Também foi demonstrado pela técnica de RT-PCR maior expressão de marcadores podocitários e diminuição de um marcador de pluripotencialidade, o OCT3/4 (Song et al, 2012).

2. RACIONAL

As doenças glomerulares constituem uma importante causa de DRC, sendo as podocitopatias uma das principais responsáveis por essa classe de doença glomerular, caracterizada por proteinúria. A proteinúria é um importante fator prognóstico na progressão da doença renal e na mortalidade geral dos pacientes. Os mecanismos envolvidos na progressão das podocitopatias para a DRC ainda não foram completamente elucidados e os tratamentos disponíveis são pouco específicos, com resultados limitados.

O desenvolvimento de modelos experimentais que permitam o estudo de mecanismos e possibilidades terapêuticas é de fundamental importância. Neste contexto, o modelo PAN representa uma interessante estratégia no sentido de mimetizar em ratos as alterações clínicas e morfológicas observadas nas doenças glomerulares. O modelo PAN consiste na administração de puromicina que causa dano glomerular através da redução do número de podócitos, resultando em podocitopatia e consequente proteinúria. No presente estudo, a fim de propiciar um modelo de podocitopatia com disfunção renal, foi utilizado o modelo PAN associado à UniNx, tornando-o ainda mais semelhante às características dos pacientes resistentes aos tratamentos atualmente empregados.

O controle da proteinúria é o principal objetivo do tratamento de pacientes portadores de glomerulopatias. Nos dias de hoje, o bloqueio do sistema renina-angiotensina-aldosterona ainda constitui a principal ferramenta para diminuir a proteinúria, eventualmente em associação com imunossupressores como ciclosporina, tacrolimus e corticóides. No entanto, seus efeitos são limitados. Neste contexto, a terapia com células tronco, considerando-se os resultados preliminares de estudos experimentais, surge como uma potencial alternativa terapêutica que merece ser investigada.

Células tronco são células que têm a capacidade de regeneração, diferenciação e auto-replicação, além de efeitos imunomoduladores importantes. Com baixa imunogenicidade e incapaz de causar rejeição alogênica, as CTm podem ser consideradas como de escolha para a terapia celular, apresentando-se como um procedimento promissor para diversas doenças, principalmente naquelas em que ocorrem perdas celulares, como as podocitopatias.

Os podócitos são células altamente especializadas, cuja complexidade estimula a incessante busca por mecanismos que possam ser utilizados no seu reparo. Assim, o objetivo principal do presente estudo foi o de analisar o possível efeito renoprotetor da infusão de CTm no modelo experimental de nefropatia crônica induzida por PAN+UniNx, através da avaliação da proteinúria e de outros parâmetros funcionais, morfológicos, celulares e moleculares. Adicionalmente, estudos *in vitro* foram realizados para tentar induzir a diferenciação de CTm em podócitos.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal do presente estudo foi o de analisar o possível efeito renoprotetor da infusão de CTm no modelo experimental de nefropatia crônica induzida por PAN.

Mais especificamente, os objetivos compreenderam:

Estudo *in vivo*

- 1) Estabelecimento do modelo de nefropatia experimental induzida por PAN (podocitopatia) em ratos Wistar;
- 2) Isolamento e caracterização de CTm derivadas de medula óssea;
- 3) Infusão de CTm em animais com podocitopatia induzida por PAN para avaliar o efeito deste tratamento:
 - a) na proteinúria e albuminúria induzida neste modelo;
 - b) nos parâmetros clínicos e laboratoriais (pressão caudal, uréia e creatinina sérica);
 - c) no desenvolvimento de lesões histológicas (glomeruloesclerose e fibrose intersticial);
 - d) nas alterações de ultraestrutura podocitária, através da quantificação da fusão dos pedicelos por microscopia eletrônica;
- 4) Análise do efeito da infusão de CTm nos podócitos de animais com nefropatia experimental induzida por PAN através da análise:
 - a) da expressão gênica de WT1, nefrina, podocina, sinaptopodina, podocalixina, utilizando-se a técnica de PCR em tempo real;
 - b) da expressão celular para o marcador podocitário WT1, nefrina e sinaptopodina, por imunohistoquímica;

- 5) Investigar o efeito da infusão de CTm na participação local de mediadores inflamatórios através da análise da expressão gênica de IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10, assim como do VEGF, utilizando-se a técnica de PCR em tempo real;
- 6) Avaliação da terapia com CTm nos mecanismos celulares do modelo PAN, através da quantificação da infiltração de macrófagos, linfócitos T e miofibroblastos, bem como a atividade proliferativa no tecido renal, por imunohistoquímica.

Adicionalmente, tentar promover a diferenciação, *in vitro*, das CTm em podócitos.

Estudo *in vitro*

- 1) Cocultura de CTm com glomérulos renais isolados de ratos, com o objetivo de tentar induzir a diferenciação das CTm em podócitos;
- 2) Isolamento de CTm de ratos Wistar e diferenciação *in vitro* destas células em podócitos, através de estímulo com colágeno IV;
- 3) Analisar a ocorrência da diferenciação celular *in vitro* de CTm em podócitos através da análise por citometria de fluxo, imunocitoquímica e PCR em tempo real de proteínas podocitárias.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo deste estudo teve a aprovação da 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 sob número de protocolo 0585/06.

4.1. Padronização do modelo PAN

A padronização do modelo PAN pode ser dividida em três fases, demonstrando a dificuldade de se obter um modelo adequado para o estudo da relação podócitos e CTm.

Na fase I iniciamos experimentos para padronizar a via caudal para a aplicação da PAN, na dose de 150 mg/kg, assim como avaliar a efetividade da droga de proporcionar proteinúria. Foram utilizados ratos Wistar, machos, em número de cinco por grupo, pesando entre 200 a 250 gramas. Os animais foram obtidos de uma colônia mantida pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Neste estudo os animais do grupo controle receberam somente a injeção de solução salina 0,9%, e os animais do grupo PAN receberam a droga na dose de 150 mg/Kg, ambos via caudal. Os dois grupos foram acompanhados por um período de 30 dias.

Posteriormente, realizamos experimentos comparativos entre duas linhagens

distintas de ratos, denominada fase II. Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 220 a 250 gramas e também ratos Lewis, machos, pesando entre 220 a 280 gramas, em número de 5 por grupo, obtidos de uma colônia mantida pelo Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Neste protocolo os dois grupos receberam a droga PAN (150 mg/Kg), via caudal, e foram sacrificados com 10, 15 ou 30 dias.

Na fase III procuramos obter um modelo com lesões crônicas e podocitopatia, e para isto procedemos a realização de UniNx e infusões adicionais de PAN com 15 e 30 dias, mantida a dose de 150 mg/kg. Também testamos a mudança da via de infusão da PAN, passando a realizar a indução da podocitopatia por via intraperitoneal (IP), a fim de facilitar o manejo dos animais. Foram utilizados 18 ratos Wistar, machos, pesando entre 230 e 350 gramas, divididos em 3 grupos, cada um com 6 animais:

GRUPO G1: animais que receberam duas doses de 150mg/kg de PAN.

GRUPO G1Nx: animais que foram submetidos a UniNx e receberam duas doses de 150mg/kg de PAN.

GRUPO G2: animais que receberam três doses de 150mg/kg de PAN.

Todos os grupos receberam dose inicial de 150 mg/kg de PAN no dia 1 via IP, sendo que no grupo G1Nx foi realizada nefrectomia via lombotomia direita. Após 15 dias, a segunda dose de PAN foi administrada para todos os grupos. Após 30 dias, apenas o grupo G2 recebeu a terceira dose da droga. Os sacrifícios foram realizados com 30, 45 e 60 dias.

Após estes experimentos de padronização do modelo PAN e avaliação dos resultados obtidos, foram realizados os seguintes estudos com a obtenção das CT e a definição dos grupos experimentais, detalhados a seguir.

4.2. Obtenção de Células Tronco

4.2.1. Extração de células da medula óssea e isolamento de CTm

As CT foram isoladas de MO obtidas de ossos longos de ratos Wistar machos, com idade entre 8 e 12 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os ratos doadores foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Ketamina-S, Cristália, São Paulo, Brasil) e Xilazina (Rompun, Bayer, Leverkusen, Alemanha) na dose de 70 mg/kg, e em seguida foi realizada a assepsia das patas traseiras com sabão, seguido de álcool 70%. Com o auxílio de um bisturi fez-se uma incisão somente na pele da pata, a fim de localizar o osso femoral esquerdo. Este osso foi exposto e removido do osso ilíaco com o auxílio de um bisturi. O osso foi colocado em um tubo cônico Falcon (Becton Dickinson, San Jose, EUA) de 15 ml e mantido em PBS estéril (Phosphate

Buffered Saline) contendo NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 7,1 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM. O mesmo procedimento foi adotado para a pata direita.

Em um fluxo laminar esterilizado previamente com luz Ultra Violeta por 30 minutos, a MO foi exposta cortando-se as extremidades dos ossos com o auxílio de uma pequena serra, e seu conteúdo interno foi retirado por lavagem (*flushing*) com 1,0 mL de PBS estéril e o auxílio de uma seringa. A homogeneização da medula foi realizada utilizando três agulhas de diferentes calibres (19, 21 e 23 G) e o volume final da suspensão foi completado para 2,0 mL com PBS estéril.

Para a realização do isolamento das CTm, a suspensão de PBS contendo células da medula óssea foi centrifugada por 5 minutos a 290g, na temperatura de 25°C (Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemanha). Em seguida o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi vigorosamente agitado. O botão de células foi ressuspensão com 1,0 mL de DMEM *low glucose* (Gibco-Invitrogen, Rockville, EUA) contendo soro fetal bovino a 10% (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil). Desta suspensão, 10,0 µL foram transferidos para um microtubo de 1,0 mL, contendo 90,0 µL de uma solução de azul de trypan (0,25%) e azida sódica (0,02%). O material foi homogeneizado e 10,0 µL da suspensão foram colocados em cada face de uma câmara de Neubauer para a contagem de células viáveis, em 16 campos. O número médio de células obtido foi multiplicado por 10 (fator de diluição com a solução de azul trypan) e por 10⁴ (fator da câmara de Neubauer), a fim de se determinar a concentração celular da suspensão (células por mililitro).

Em seguida, essas células foram cultivadas em garrafas estéreis de 25 cm² (Corning Life Science, Lowell, EUA) próprias para cultivo celular e mantidas em estufa a 37 °C, a 5% de CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Marietta, EUA). A troca do meio de cultura foi realizada a cada 3 dias até a obtenção de confluência celular de 80%.

4.2.2. Método de tripsinização

Após atingir a confluência, com crescimento em colônia e formato fibroblastóide, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com PBS estéril por 3 vezes. Foram adicionados 3,0 mL de solução de tripsina 0,25% (Gibco-Invitrogen, Rockville, EUA) a 37 °C por 3 minutos. Estas garrafas foram agitadas levemente para o desprendimento total das células e em seguida, para inibir a ação da tripsina, foi utilizado meio de cultura suplementado com SFB 10%. Depois, as células foram transferidas para tubos cônicos de 15,0 mL (Becton Dickinson, San Jose, EUA) e centrifugados (290g por 5 minutos à 4°C, (centrífuga Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemanha).

O sobrenadante foi desprezado e o botão celular foi ressuspenso com 1,0 mL de meio de cultura completo (DMEM-Low Glucose + 10%SFB + antibióticos). Em seguida foi realizada a contagem de células viáveis utilizando a coloração de azul de trypan, e a partir dessa contagem as CTm foram novamente plaqueadas. A tripsinização e o replaqueamento das células são determinados como passagem celular.

4.2.3. Cultivo e expansão das CTm

Após a contagem celular, foram cultivadas 15×10^4 céls/mL de CTM em garrafas de 25cm^2 (Corning Life Science, Lowell, EUA), contendo meio de cultura completo e incubadas em estufa úmida a 37°C a 5% de CO_2 (Thermo Fisher Scientific, Marietta, EUA). O cultivo celular foi monitorado sob microscopia invertida, e o meio de cultura foi trocado 3 vezes por semana.

As células foram replicadas sempre que atingiram uma confluência de 80%. Então, eram novamente tripsinizadas, contadas e replaqueadas. As células utilizadas para este projeto foram mantidas em cultura até a 4ª passagem celular.

4.2.4. Caracterização das CTm por citometria de fluxo

A caracterização das populações celulares presentes nas amostras de MO foi determinada pelo método de citometria de fluxo. A presença dos marcadores celulares foi verificada através de diferentes anticorpos monoclonais (**Tabela 1**) conjugados com diferentes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*), ficoeritina (PE, do inglês *phycoeritin*) e ficoeritina-Cy.5 (Pe-Cy.5, do inglês *phycoeritin-Cy.5*). Controles de marcações inespecíficas foram utilizados para a adequada calibração do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra. Todos os anticorpos foram adquiridos da empresa Caltag, Invitrogen, Brasil.

Tabela 1. Anticorpos utilizados para caracterização das células isoladas da medula óssea como CTm.

Anticorpo	Especificidade	Fluorocromo conjugado
CD-31	Endotelial	FITC
CD-34	CTH	PE
CD-44	CTM	PE
CD-45	Pan-leucocitário	PE Cy5.5
CD-90	CTM	FITC

As células obtidas e quantificadas como descrita anteriormente foram ajustadas à concentração de $2,5 \times 10^6$ em 500 μL . Em seguida, 100 μL foram transferidos para um tubo específico para citometria (Becton Dickinson, San Jose, EUA) e incubados com os anticorpos conjugados aos fluorocromos por um período de 15 minutos, em campo escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 2,0 mL de PBS e centrifugados a 290g por 5 minutos a 4°C (Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi homogeneizado e ressuspenso em 500,0 μL de solução de formaldeído diluído a 1% em PBS (Formaldeído PA, Vetec, Brasil) e estocado em

geladeira ao abrigo da luz por um período máximo de 24 horas, até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

As células foram adquiridas e a intensidade de fluorescência foi captada pelo citômetro de fluxo no aparelho *FacScaliburTM* (Becton Dickinson, San Jose, CA. EUA). Os dados foram analisados no *CELLQuestTM* (Becton Dickinson, San Jose, CA. EUA). Para cada amostra foi realizada uma aquisição de 10.000 eventos. Os resultados foram fornecidos e analisados na forma de histogramas e em percentual da população celular com reação positiva para cada anticorpo.

4.2.5. Caracterização das CTm por diferenciação celular

4.2.5. a) Diferenciação das CTm em células osteogênicas: A diferenciação osteogênica de cultura de CTm de rato Wistar foi executada seguindo o protocolo de (Morigi et al, 2004). As células aderentes foram cultivadas em placas de 6 poços na densidade celular de 3×10^3 céls/mL, com meio completo por 5 dias. A seguir foi realizada a substituição do meio de cultura por um meio condicionado, próprio para diferenciação osteogênica. O meio completo foi suplementado com β -glicero-fosfato 10 mM, 50,0 μ g/mL de ácido ascórbico e dexametasona 100 nM (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Para o controle de diferenciação celular, foram realizados cultivos somente com meio de cultura completo. A placa foi mantida em estufa úmida a 37°C a 5% de CO₂ e com troca de meio 2 vezes por semana, num período de incubação de 21 dias. Depois de completar o

período de incubação, as células foram lavadas com PBS por 5 minutos e, em seguida, adicionou-se a solução para coloração da fosfatase alcalina (N,N Dimetilformamida C_3H_7NO , Naphtol ASMX; Fast Red; Tris pH 9,0) por 30 minutos a 37°C. Foram lavadas posteriormente com PBS e fixadas com formaldeído a 4% por 5 minutos. Esta coloração foi utilizada para verificar a atividade da fosfatase alcalina.

Para evidenciar a presença de cálcio nas células foi realizada a coloração de Vermelho de alizarina, onde primeiramente as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida lavada em água corrente e corada por 15 minutos com vermelho de alizarina 97% (Sigma-Aldrich, Saint Louis , EUA). Após esse período, as placas foram novamente lavadas com água destilada. Todas as placas foram armazenadas a 4 °C em geladeira.

4.2.5. b) Diferenciação das CTm em células adipogênicas: A técnica para diferenciação adipogênica de cultura de CTm de rato Wistar foi padronizada a partir de diferentes protocolos testados em nosso laboratório. As células foram extraídas da MO como descrito anteriormente, colocadas em placas de 6 poços na concentração de 5×10^4 células por poço e mantidas em meio DMEM-low glicose mais SFB a 10%, por 7 dias. A partir do 7º dia adicionou-se Insulina (2,5 µg/ml), Dexametasona ($1 \cdot 10^{-8}$ M) e Indometacina (100 µM) ao meio de cultura, com trocas do meio a cada 3 dias, mantendo o estímulo por 21 dias. Depois de completado o período de incubação, as células foram fixadas com formalina 1% por 15 minutos e lavadas com isopropanol 60%.

Posteriormente as células foram incubadas por 10 minutos com Oil Red 0,2% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) para coloração. Após lavagem com água deionizada foram observados ao microscópio a presença de vacúolos lipídicos corados em vermelho.

4.2.6. Infusão e identificação de CTm no órgão alvo

4.2.6. a) Marcação da CTm com CM-Dil: Após o isolamento, CTm foram incubadas com o marcador de membrana CellTracker™ CM-Dil (Invitrogen, Eugene, EUA) a fim de localizar posteriormente as células transplantadas através da fluorescência. Inicialmente as células foram tripsinizadas como descrito anteriormente, contadas e divididas em alíquotas de na concentração de 2×10^5 céls/mm. As CTM foram incubadas por 30 minutos com o CM-Dil na concentração de 10 μ M. Os primeiros 15 minutos as células permaneceram a 37 °C, e nos 15 minutos finais a 4 °C. Em seguida foram realizados os procedimentos cirúrgicos para a inoculação das células nos grupos experimentais. Para a visualização das células marcadas foi utilizado um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80I, Tóquio, Japão).

4.2.6. b) Padronização da infusão de CTm sub capsular renal: Foram realizados experimentos para padronizar a técnica de inoculação das CTm no espaço subcapsular renal, a fim de proporcionar um número maior de células e por mais tempo à região lesionada. Foram inoculadas CTm previamente marcadas com CM-Dil em 20 ratos Wistar machos, pesando entre 220 a 270g, submetidos à nefrectomia direita e que receberam a dose inicial de PAN (150 mg/kg). Os animais foram divididos em grupos e

sacrificados em diferentes tempos: 24 horas, 5, 10, 15 E 30 dias após a inoculação via subcapsular. O rim esquerdo foi seccionado e os cortes imersos em meio de inclusão Tissue-Tek[®] (Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Holanda) para criopreservação e posterior análise histológica no microscópio de imunofluorescência (Nikon Eclipse 80i, Tóquio, Japão).

4.3. Desenho do Estudo

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 190 e 220 gramas, obtidos de uma colônia mantida pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 52 animais foram divididos em 3 grupos e alojados em gaiolas individuais e mantidos à temperatura de 22 °C, num ciclo claro/escuro de 12 horas, com dieta normossódica e água *ad libitum* (Figura 4 e Figura 5).

Grupo Controle: animais que foram submetidos à UniNx e receberam solução fisiológica 0,9% (SF), via IP, no intervalo de 15 dias, com infusão subcapsular renal de SF (n = 18).

Grupo PAN: animais que foram submetidos à UniNx e receberam duas doses de PAN, 150mg/kg e 50mg/kg, via IP, no intervalo de 15 dias, com infusão subcapsular renal de SF (n = 18).

Grupo PAN + CTm: animais que foram submetidos à UniNx e receberam 2 doses de PAN, 150mg/kg e 50mg/kg no intervalo de 15 dias, com infusão subcapsular renal de CTm (2×10^5 células) no dia 0 (n = 16).

Figura 4. Caracterização dos grupos durante o estudo.

Figura 5. Desenho e protocolo do estudo.

Inicialmente os animais foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina (Ketamina-S, Cristalia, São Paulo, Brasil) e Xilazina (Rompun, Bayer, Leverkusen, Alemanha) (70 mg/Kg) e em seguida realizou-se a nefrectomia direita através de acesso por lombotomia. Ainda, por outro acesso, via lombar esquerda, infundiu-se na região subcapsular renal SF ou CTm, de acordo com o respectivo grupo. Com o auxílio de um capilar de plástico estéril as CTm foram colocadas sob a cápsula renal e injetadas com o auxílio de um micro-injetor. Foram inoculadas 2×10^5 CTm, em 10 μ L de PBS, na região subcapsular. O micro-injetor consistiu de uma seringa de vidro de 1,0 mL acoplada a uma escala de 0,001mm.

Para a sutura da musculatura abdominal foi usado fio cromado 5-0 (Brasuture, São Sebastião da Grama, Brasil), utilizando pontos contínuos e a sutura da pele foi realizada com fio de algodão 4-0 (Brasuture, São Sebastião da Grama, Brasil). Por fim, injetamos uma dose de 150 mg/Kg de PAN, via IP. A segunda dose da PAN (50 mg/kg) ou SF foi administrada 15 dias após esta 1ª dose.

Os animais foram sacrificados com 30 e 60 dias. Aos 30 dias foram sacrificados 8 animais no grupo Controle e no grupo PAN, e 6 animais no grupo PAN+CTm. Aos 60 dias, 10 animais por grupo foram sacrificados. Eles foram anestesiados através de injeção intraperitoneal do coquetel cloridrato de cetamina/xilazina na dose letal de 120mg/kg/16mg/kg. Com os animais anestesiados foi coletado sangue através de punção em ventrículo direito sob visão direta e canulada a artéria renal esquerda com “butterfly”

26G (Exelint International CO, Los Angeles, EUA). Em seguida foi injetado soro fisiológico 0,9% com auxílio de bomba peristáltica Minipuls 3[®] (Gilson, Middleton, EUA), perfundindo totalmente o rim antes da nefrectomia. Em seguida, a eutanásia foi realizada através da retirada do coração. As carcaças dos animais foram colocadas em sacos apropriados para descarte de material biológico e congeladas em freezer - 20°C até a data da incineração.

4.4 Metodologia

4.4.1. Parâmetros Clínicos e Laboratoriais

4.4.1.a) Evolução Ponderal: Os animais foram pesados nos dias 0, 15, 30, 45 e 60 e os valores utilizados para determinar a evolução ponderal durante o experimento.

4.4.1.b) Medida da pressão caudal: A pressão arterial foi aferida pelo método da pressão caudal, através de aparelho *Harvard Indirect Rat Tail Blood Pressure* (Harvard Apparatus Ltd, Eden Bridge, Kent, Inglaterra) acoplado a um sistema computadorizado de registro (programa Coda-Dataq Instruments, Ohio, EUA). A pressão de cada animal foi verificada nos dias 0, 30 e 60. A média de 5 aferições foi considerada a pressão arterial sistólica definitiva.

4.4.1.c) Bioquímica renal: O volume urinário de 24 horas coletado foi medido e centrifugado durante 10 minutos. A dosagem de proteinúria foi realizada pela reação da proteína urinária total com o ácido sulfossalicílico, formando suspensão medida por espectrofotômetro a 530 nm, comparada a uma curva padrão de albumina (mg/mL). A proteinúria foi calculada pela multiplicação do volume de urina medido em 24 horas (em mL) pela concentração de proteína em mg/ml, resultando em um valor de mg/24h. A mensuração da albuminúria foi realizada pelo método de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) com o Rat Albumin ELISA Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, EUA). Este kit é baseado em um sanduíche de ELISA. A albumina contida nas amostras urinárias diluídas dos animais é capturada por anticorpos anti-albumina de rato pré adsorvidos à placa. Após 1 hora a placa foi lavada e um anticorpo biotinilado foi adicionado para se ligar à albumina capturada. Nova lavagem foi efetuada após 1 hora, e estreptavidina conjugada com peroxidase (SA-HRP) adicionada para catalisar a reação colorimétrica com o substrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico, e o produto da reação da peroxidase se tornou amarelo, sendo quantificado pelo leitor de Elisa Versamax[®] (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA), através da absorbância a 450 nm. A dosagem da creatinina sérica (SCr) das amostras de sangue colhidas 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, cuja

absorbância a 510nm é determinada em espectrofotômetro (Spectronic 20 Genesys, Thermo Fisher Scientific, Marietta, EUA). A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromógenos, que também é medida espectrofotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina verdadeira, em mg/dL. A mensuração da concentração sérica de uréia foi realizada pelo método de Crocker modificado, com leitura das amostras na absorbância de 530 nm em espectrofotômetro.

4.4.2. Histologia

4.4.2.a) Coleta e processamento do tecido: Os fragmentos de tecido foram colocados em solução de Duboscq-Brazil durante 40 minutos e em seguida transferidos para solução de formol a 4% em tampão fosfato salino e incluídos em blocos de parafina. O processo de parafinização foi realizado em processador automático de tecido “histokinette” (Jung-Histokinette 2000 Leica, Nussloch, Alemanha) e durou 14 horas. O processo foi iniciado pela desidratação dos tecidos em álcoois com concentrações progressivas (álcool 50%, álcool 70%, álcool 96% (2 banhos), álcool absoluto (2 banhos), seguida da diafanização, passando os tecidos em uma solução de álcool absoluto + xilol e, na sequência, por três banhos de xilol, sendo então imersos em parafina fundida a 60°C. O material parafinizado foi incluído em blocos e permaneceu em temperatura ambiente. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica,

Nussloch, Alemanha) com navalhas descartáveis. As seções, com espessura de 3 a 4 µm, foram aderidas em lâminas previamente revestidas por silano 2% (Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA). As lâminas com os cortes permaneceram em estufa (Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil) a 60°C por 2 horas e em seguida foram armazenadas em temperatura ambiente.

4.4.2.b) Desparafinização: Antes de serem utilizadas as lâminas passaram pelo processo de desparafinização. Após 30 minutos em estufa a 60°C, as lâminas foram imersas em xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 9 minutos, por 3 vezes. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos (2 vezes), em etanol 96% por 3 minutos (2 vezes) e para finalizar este processo foram imersas em água destilada e processadas.

4.4.2.c) Coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS): Para avaliação do comprometimento estrutural das lesões glomerulares foi utilizada a técnica histológica do ácido periódico de Schiff (PAS). Para a reação de PAS, as lâminas foram lavadas em água destilada e mantidas em ácido periódico 1% durante 10 minutos, sendo lavadas em seguida novamente com água destilada. Foram então coradas pelo reativo de Schiff por 45 minutos em ambiente escuro e lavadas em água corrente durante 10 a 15 minutos. A contra coloração foi realizada com a hematoxilina de Harris (preparada no laboratório) por 5 minutos, lavadas em água corrente e montadas com lamínulas com o meio permanente *Permount* (Fisher Chemical, Pittsburgh, EUA).

4.4.2.d) Coloração pelo Tricrômio de Masson: Para avaliação do grau de expansão do interstício renal foi utilizada a coloração de Masson. As lâminas foram imersas em uma solução de hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Em seguida, foram lavadas rapidamente em água corrente, permanecendo no escarlate de Briebrich durante 5 minutos e novamente lavadas em água corrente. Em seguida, as lâminas foram submersas no diferenciador de Masson (preparado no laboratório) durante 5 minutos, seguido de uma solução de anilina a 5%, durante 5 minutos e, posteriormente, lavadas em água corrente. O próximo passo foi a lavagem das lâminas em água acética a 1% para fixação da anilina, seguido da desidratação, diafanização e montagem em meio permanente *Permount* (Fisher Chemical, Pittsburgh, EUA).

4.4.2.e) Análise das lâminas: Todas as lâminas foram analisadas por patologista, sendo que o mesmo permaneceu cego para os grupos. Para a avaliação da fração de tecido intersticial renal, as lâminas foram coradas pelo tricômio de Masson e foi utilizada a técnica de contagem de pontos. Esta técnica consiste em um sistema de microscópio acoplado a um monitor de vídeo com uma ocular graticulada de 110 pontos. Foram contados os pontos corados positivamente pelo Masson, analisando-se 25 campos consecutivos sob um aumento de 400x. Os resultados são fornecidos em porcentagem da área de expansão do interstício (%INT). A coloração do PAS foi utilizada para a avaliação dos índices de esclerose glomerular (GS) examinando-se sucessivamente todos os glomérulos contidos na lâmina. A

freqüência de cada categoria de lesão glomerular foi expressa como porcentagem total do número de glomérulos acometidos.

4.4.3. Imunohistoquímica

Para os experimentos de imunohistoquímica foi realizado inicialmente a coleta, processamento do tecido e desparafinização como já descrito nos itens 4.4.2. a e 4.4.2. b.

Com o objetivo de aumentar a expressão antigênica, após a desparafinização, as lâminas foram imersas em tampão citrato 10 mM, pH=6,0 e levadas em forno micro-ondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2400 watts durante 15 minutos. As lâminas permaneceram no tampão até atingir a temperatura ambiente, e foram então hidratadas em tampão TBS (salina tris tamponada, contendo NaCl 0,0135 M e Tris 0,050 M, pH 7,6). Os anticorpos utilizados foram titulados em experimentos anteriores, e o controle negativo foi feito omitindo o anticorpo primário.

4.4.3.a) Detecção de macrófagos e linfócitos T: Os macrófagos foram identificados no tecido renal através do anticorpo monoclonal anti-monócito/macrófago de rato (anti ED 1) (AbD Serotec, Raleigh, EUA), produzido em camundongo, e os linfócitos T através do anticorpo monoclonal anti-linfócitos de rato (anti CD 43) (AbD Serotec, Raleigh, EUA). Para ambos os anticorpos foi utilizado o kit LSAB-AP (*Labeled Streptavidin-Biotin-Alcaline Phosphatase*, Dako Co, Glostrup, Dinamarca) e todo o

processo foi realizado em câmara úmida. Após a desparafinização e a recuperação antigênica, a biotina endógena do tecido foi bloqueada através da incubação com solução de avidina D (Vector, Burlingame, EUA), seguida pela incubação com uma solução de biotina (Vector, Burlingame, EUA). Os fragmentos de tecido foram incubados durante 15 minutos com cada uma das soluções, e lavadas com TBS durante 5 minutos após cada uma. Para bloqueio de antígenos inespecíficos, os fragmentos de tecido foram incubados com *Dako Protein Block Solution* por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi retirado o excesso de solução e o tecido foi incubado com o anticorpo anti-ED1 (diluído 200 vezes em TBS), ou anti-linfócito T (diluído 200 vezes em TBS), durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS por 5 minutos e incubadas com a solução de anticorpos secundários biotinilados (*Biotinylated Link Universal*) fornecida pelo kit, por 30 minutos, a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas com o complexo *Streptavidin-Biotin-AP* do kit por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com TBS e submetidas à revelação. Para a revelação, as lâminas foram incubadas com uma solução contendo substrato para a enzima fosfatase alcalina e o corante fast-red (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA), preparada da seguinte maneira: 1,0 mg de naftol fosfato AS-MX (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) foram diluídos em 100 µl de dimetilformamida (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, a solução foi diluída em 4,9 mL de tampão Tris 0,1 M (pH 8,2) e 10 µL de levamisol 1 M (Sigma Chemical CO, St Louis, EUA) foram acrescentados. Esta solução ficou armazenada a

-20°C e, no momento da revelação, foi misturada com 5,0 mg do corante *fast-red*. A revelação foi realizada sob microscopia em aumento de 100X e as células positivas apresentaram coloração avermelhada. O tempo de revelação foi de aproximadamente 10 minutos. As lâminas foram contra coradas com *Hemalaun* - hematoxilina segundo Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 2 minutos, lavadas em água corrente e foram então montadas com glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.4.3.b) Detecção de miofibroblastos: A identificação de miofibroblastos foi realizada através do anticorpo monoclonal anti- α -actina de músculo liso de rato (Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA) e do kit *Streptavidin-Biotin-Alcaline Phosphatase* Dako, Carpinteria, EUA). Após a desparafinização, recuperação de antígenos e bloqueio da biotina endógena do tecido como descrito no item anterior, as lâminas foram incubadas com soro de cavalo (Vector, Burlingame, EUA), diluído 70 vezes em TBS, por 30 minutos, e após a retirada do excesso do soro, foram incubadas com imunoglobulina anti- α -actina de músculo liso, diluída 800 vezes em TBS, durante a noite à 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas durante 45 minutos com anticorpo de cavalo anti-camundongo biotinilado, adsorvido em rato (Vector, Burlingame, EUA), diluído 200 vezes em TBS. Após lavagem de 5 minutos em TBS, as lâminas foram incubadas com o complexo estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina por 30 minutos, lavadas novamente em TBS e submetidas à revelação. A solução de revelação contendo substrato para a fosfatase alcalina e *fast red* como descrito no ítem anterior. A revelação foi acompanhada sob microscopia em aumento de

100x e as células positivas apresentaram coloração avermelhada. O tempo de revelação foi de aproximadamente 12 minutos. As lâminas foram contra coradas e montadas como descrito no item anterior.

4.4.3.c) Detecção da atividade de proliferação celular: A identificação de células em proliferação foi realizada através da marcação de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) utilizando o kit LSAB-HRP (*Labeled Streptavidin-Biotin Horseradish Peroxidase*). Para a realização da técnica foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-PCNA de rato produzido em camundongo (Dako Co; Glostrup, Dinamarca). Após a desparafinização e recuperação de antígenos, a peroxidase endógena do tecido foi bloqueada com *Peroxidase block solution* (Dako Co; Glostrup, Dinamarca) por 15 minutos, seguido de lavagem com TBS por 5 minutos. A biotina endógena do tecido foi bloqueada como descrito anteriormente, os fragmentos foram então incubados com *Protein block solution* (Dako Co; Glostrup, Dinamarca) por 15 minutos para bloqueio de antígenos inespecíficos. Os fragmentos foram então incubados com o anticorpo diluído 200 vezes em TBS, durante a noite à 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com a solução de anticorpos secundários biotinilados (*Biotinylated Link Universal*) do kit.

As lâminas foram lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas por 30 minutos com o complexo *Streptavidin-Biotin-HRP* do kit. As lâminas foram novamente lavadas com TBS e submetidas à revelação com DAB + *Chromogen kit* (Dako Co; Glostrup, Dinamarca) por 12 minutos. O tecido foi contra corado por 1 minuto com Hematoxilina (Leica Novocastra, Newcastle

Upon Tyne, Reino Unido) e as lâminas foram montadas como descrito anteriormente.

4.4.3.d) Detecção de podócitos: A presença dos marcadores de podócitos WT1 e Sinaptopodina, assim como da proteína de fenda diafragmática Nefrina foi estudada através da técnica de imunoperoxidase, utilizando o kit NovoLink® (Leica Novocastra, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido). Após a desparafinização e recuperação de antígenos, a peroxidase endógena do tecido e os antígenos inespecíficos foram bloqueados em incubações de 5 minutos cada com as soluções *Peroxidase block* e *Protein block*. Em seguida foram incubados com os respectivos anticorpos primários durante a noite, à 4°C, em câmara úmida: *mouse monoclonal* anti-human WT1 (Dako Co, Glostrup, Dinamarca) diluído 50 vezes em TBS, *rabbit polyclonal* anti nefrina (gentilmente cedido pelo Dr Lawrence B. Holzman, Universidade da Pensilvânia, Philadelphia, EUA) diluído 500 vezes e *mouse monoclonal* anti Sinaptopodina (Progen Biotechnik, Heidelberg, Alemanha) diluído 800 vezes. Em seguida procedeu-se a incubação com a solução *Post Primary Block* por 30 minutos, seguida do complexo *NovoLink Polymer* por 30 minutos. Todas as etapas foram intercaladas por duas lavagens (5 minutos cada, sob agitação) em TBS. Para a revelação os fragmentos de tecido foram incubados com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), diluído em tampão substrato apropriado, fornecido pelo fabricante. A revelação foi realizada sob aumento microscópico de 100 vezes, com duração de aproximadamente 8 minutos para o WT1 e 10 minutos para nefrina e sinaptopodina, sendo que as células positivas neste tipo de reação

apresentaram cor marrom. A contracoloração foi realizada com a hematoxilina contida no kit e as lâminas foram montadas como descrito anteriormente.

4.4.3.e) Quantificação: Para avaliar a expressão de macrófago e linfócito-T, no córtex e na medula, foi analisado todo o tecido renal no aumento de 400 e 200 vezes, respectivamente. Foram contados 25 campos e a média foi expressa em células por mm². A quantificação da expressão da α -actina foi realizada pelo método de contagem de pontos, já descrito no item 3.5.1.e. Foram contados os pontos que correspondiam à área marcada para α -actina, analisando-se 25 campos consecutivos sob um aumento de 200x. Os resultados são fornecidos em porcentagem de área marcada. Para avaliar a expressão de PCNA no córtex, foi analisado todo o tecido renal no aumento de 200 vezes. Foram contados 25 campos e a média foi expressa em células por mm². Para avaliar a expressão de WT1, inicialmente foram fotografados 25 glomérulos de cada animal (*Infinity Capture Imaging Software, Lumenera, Ottawa, Canada*) e em seguida a porcentagem da área correspondente aos podócitos foi quantificada com o software Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Bethesda, EUA). A expressão da nefrina e da sinaptopodina não foram quantificadas e as imagens adquiridas no aumento de 400x foram utilizadas para melhor ilustrar os resultados.

4.4.4. Microscopia Eletrônica

4.4.4.a) Coleta e processamento do tecido: Inicialmente o fragmento para a microscopia eletrônica foi seccionado em partes menores de aproximadamente 2 mm x 2 mm e incubados por 2 horas a temperatura ambiente em solução de glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2. Em seguida foram lavados com soro fisiológico 0,9% e preparados para fixação com solução de tetróxido de ósmio 1%. Após 1 hora os fragmentos foram lavados e imersos em solução de acetato de uranila, permanecendo “overnight” à temperatura de 4°C. Na sequência, foram realizados banhos de acetona e óxido de propileno para inclusão do material em resina pura, permanecendo assim em temperatura de 60°C por 72 horas e posteriormente utilizados para o primeiro corte da peça, denominado semifino. O corte semi-fino possui espessura em torno de 300 a 350 nm, e foi corado com azul de metileno 1% e azur II 1%, na proporção de 1:1. As lâminas foram montadas com lamínulas e submetidas à análise no microscópio óptico para determinação do glomérulo a ser submetido ao corte ultrafino. Por fim, o corte ultrafino apresentando espessura de aproximadamente 70 nm foi colocado em tela de cobre e armazenado em temperatura ambiente para posterior visualização no microscópio eletrônico.

4.4.4.b) Quantificação: Os cortes ultrafinos de glomérulos foram visualizados pelo microscópio eletrônico Tecnai 10 (Philips, Eindhoven, Holanda), sendo identificados e fotografados os processos podocitários. Para determinar a largura média dos pedicelos (LMP), 30 fotos de cada

animal foram realizadas com aumento de 15000x. Em cada imagem foi mensurado o comprimento total da membrana basal (MBG), utilizando o software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, EUA). O número total de fendas diafragmáticas (FD) de cada imagem foi contado e utilizado para estimar a largura média do pedicelo através da seguinte fórmula, sendo o resultado expresso em nm (Hauser et al, 2010) (**Figura 6**).

A

$$LMP = \pi/4 \times \Sigma MBG / \Sigma FD$$

Figura 6. A. Fórmula utilizada para mensuração da largura média dos pedicelos.

B. Fotografia de pedicelos em aumento de 15.000x. A linha amarela foi utilizada para calcular o comprimento da MBG e as setas demonstram algumas FD.

4.4.5. PCR em tempo real

4.4.5 a) Extração de RNA: Todas as soluções utilizadas para a extração de RNA foram feitas com água deionizada através do sistema *Milli-Q* (Millipore, Milli-Q Element A10 System, Massachusetts, EUA) e tratada com dietilpirocarbonato (Sigma, Sto Louis, EUA). Para cada litro de água

deionizada, foram adicionados 1,0 mL de dietilpirocarbonato e a solução foi mantida a 60°C sob agitação por cerca de 12 horas, sendo em seguida autoclavada (121°C por 20 minutos). RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante. Cada 100 mg de tecido foi homogenizado com 1 mL de Trizol com auxílio de um dispersador de tecidos (IKA – Labortechnik Ultra Turrax T25 Janke & Kunkel, 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 12.000 g a 4°C por 20 minutos. A fase superior contendo RNA foi transferida para um microtubo de 2 mL contendo o mesmo volume de isopropanol gelado (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA). As amostras foram centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, o pellet de RNA foi ressuscitado com 1 mL de etanol 70% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e centrifugado novamente a 12.000g por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por mais uma vez e, por último, o pellet foi reconstituído com 100µL de água previamente tratada com dietilpirocarbonato. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (*NanoDrop*, Thermo Fisher Scientific, Marietta, EUA) medindo-se a densidade óptica nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Foi feito o cálculo da concentração de RNA, expresso em µg/mL, a partir da absorbância à 260nm. A leitura de 1 OD corresponde a uma solução pura de RNA em fita-simples na concentração de 40 µg/mL. A leitura a 280 nm foi utilizada para determinar a contaminação das amostras

com proteínas. A análise foi feita baseando-se na razão entre as absorvâncias a 260 e 280nm e o valor aceitável foi de 1,7 a 2,0.

4.4.5 b) Síntese de cDNA: 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 (500µg/ml) foi misturado com 11 µl de uma solução de RNA a 80 ng/µl. Esta solução foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 4µl de tampão [5X] (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, cloreto de potássio 375 mM, cloreto de magnésio 15 mM) , 2µl de DTT 0,1M, 1 µl de dNTP Mix (10mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e 1µl (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.

4.4.5 c) PCR em tempo real: Para esta etapa, foram confeccionados pares de primers para a obtenção de amplicons com no máximo 250 pb, conforme recomendação para PCR em tempo real (qPCR). Os primers utilizados estão representados na **Tabela 2**.

Para a qPCR foi utilizado o kit *SYBR Greener qPCR SuperMix Universal* (Invitrogen, Califórnia, EUA). Um microlitro de cDNA foi acrescido de 7,5 µL de *mix do kit*, 0,6 µL de primer *forward* (10µM), 0,6 µL de primer *reverse* (10 µM), 5,75 µl de água deionizada e 0,15 µl de *Rox*. Todas as reações foram

realizadas em triplicatas. 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. O equipamento utilizado foi o *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Singapura).

A expressão gênica foi determinada pela expressão relativa entre o gene alvo e o gene *housekeeping* β -actina, conforme cálculo realizado pelo software do aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Singapura), a partir dos cycles threshold (CTs) das reações.

Tabela 2. Primers utilizados para PCR em tempo real.

Gene alvo	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Pb
WT1	GGACCCTTCGGTCCTCCCCC	GCTGGCTCTCCAGGCAGCTG	77
Nefrina	TAATGTGTCTGCGGCCAG	TGTTGGTGTGGTCAGAGCCA	97
Podocina	GACGCTGTCTGCTACTACCGCAT	CGATGTGCCAAGAGGCGCTTC	119
Sinaptopodina	GAATCTATGGCACGCCGAGGCAG	TGCCTCCGCTTCTCATCAGCTGT	119
Podocalixina	CTGCATGGCATCCTTCCTGCTCC	TCCTCTGGGAGATCCGCTGGTG	71
IL-1 β	CCTTGTGCAAGTGTCTGAAGCAGC	GCCACAGCTTCTCCACAGCCA	90
IL-4	TGGGTCTCAGCCCCACCTT	TCCGTGGATACCGTTCCCGGT	82
TNF α	TGGCCCAGACCCTCACACTCA	GGCTCAGCCACTCCAGCTGC	82
IL-10	TACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGG	CACAGGGGAGAAATCGATGACAGCG	100
VEGF	ACTGTGAGCCTTGTTTCAGAGCGG	TCAAGCTGCCTCGCCTTGCA	109
β -actina	AGGAGTACGATGAGTCCGGCCC	GCAGCTCAGTAACAGTCCGCCT	70

4.5. Estudos *in vitro*

4.5.1. Isolamento, cultivo e caracterização de glomérulos *in vitro*

Os glomérulos foram isolados do córtex renal de ratos Wistar machos (200-250g) com idade entre 8 e 12 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de USP.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Ketamina-S, Cristalia, São Paulo, Brasil) e Xilazina (Rompun, Bayer, Leverkusen, Alemanha) na dose de 70 mg/Kg e em seguida foi realizada a assepsia da região abdominal com álcool 70%. O acesso intracavitário foi realizado por laparotomia mediana, sendo os rins retirados e mantidos em PBS pH 7,4 a 4°C.

Posteriormente, em fluxo laminar, foi retirada a cápsula renal e separado a medula do córtex. O córtex foi seccionado com o auxílio de um bisturi até adquirir uma consistência pastosa. Em seguida, após a adição de PBS, o material foi filtrado através de peneiras com poros de diâmetros gradualmente menores: 250 µm, 120 µm e por fim 70 µm, na qual os glomérulos ficam retidos.

Os glomérulos retirados da peneira foram suspensos em PBS estéril e centrifugados 3 vezes por 5 minutos a 300g, a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os glomérulos foram ressuspensos em 1,0 mL de meio DMEM *low glucose* 10% SFB, transferidos para placas de 6 wells previamente preparadas com 1,0 ml SFB 10% e mantidos em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, com troca de meio a cada 3 dias.

4.5.1.a) Imunocitoquímica de glomérulos: Os glomérulos obtidos de cultivo foram aderidos às lâminas em centrífuga tipo Cytospin (Incibrás, São Paulo, Brasil) colocando-se 250 µL da suspensão em cada suporte de filtro citológico e centrifugando-se por 1min a 300g Posteriormente foram fixados em acetona a 4°C por 7 minutos. Após secarem as lâminas foram transferidas para TBS (Tris Buffered Saline – Solução Tris HCl 0,05M + Solução NaCl 0,9%, PH 7,6). A presença do marcador de podócitos WT1 foi analisada através de imunocitoquímica utilizando a técnica de imunoperoxidase com o kit NovoLink® (Leica Novocastra, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido). Os glomérulos foram inicialmente submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena e dos antígenos inespecíficos, utilizando para isto os reagentes do kit “Peroxidase block” e “Protein block”, em incubações de 5 minutos intervalados por lavagens em TBS. Em seguida foram incubados com o anticorpo primário monoclonal mouse anti-human WT1 (Dako, Dinamarca) diluído 1:50, em TBS, durante a noite, à 4°C, em câmara úmida. Em seguida procedeu-se o bloqueio pós primário com a solução de caseína do kit, seguida da incubação com o complexo “NovoLink Polymer” por 30 minutos. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida à temperatura ambiente, e intercaladas por duas lavagens (5 minutos, cada sob agitação) em TBS. Controles negativos, nos quais se omitiu o anticorpo primário foram realizados em todos os casos. Para a visualização, os glomérulos foram incubados com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), diluído em tampão substrato apropriado, fornecido pelo fabricante. A

revelação foi realizada sob aumento microscópico de 100 vezes, com duração de aproximadamente 7 minutos, e as células positivas neste tipo de reação apresentaram cor marrom. As lâminas foram montadas com Glicergel[®] (DAKO, Copenhagen, Dinamarca) previamente aquecido.

4.5.2. Cocultura de CTm e glomérulos

A cocultura de CTm com glomérulos foi realizada em garrafas estéreis próprias para cultivo celular e mantidas em estufa a 37 °C a 5% de CO₂, em DMEM *low glucose* contendo soro fetal bovino a 10%. Foram utilizadas células em 3^a passagem, sendo plaqueadas 1x10⁵ células e aproximadamente 50 glomérulos por garrafa. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Realizou-se o cultivo separadamente de dois grupos, conforme os protocolos descritos a seguir (**Figura 7**). Cada protocolo foi realizado em 3 diferentes tempos.

Protocolo 1 **Protocolo 2**

Figura 7. Protocolos 1 e 2 da cocultura de CTm e glomérulos, com os respectivos dias dos experimentos

4.5.3. Cultura de CTm com colágeno IV

Para a realização do experimento foram utilizadas CTm em primeira passagem, entre o 7º e 10º dia. Após tripsinização, as células foram colocadas em placas de 6 poços contendo colágeno IV (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). A densidade de inóculo foi de 2×10^5 células por poço, em meio de cultura α MEM *low glucose* contendo soro fetal bovino a 10% mais antibióticos a 1%, com trocas a cada dois dias. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C a 5% de CO₂ por 7 dias. Paralelamente, como controle, CTm foram cultivadas em placas de 6 poços sem colágeno IV

(Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) (**Figura 8**). Os experimentos foram realizados em 3 diferentes tempos.

Figura 8. Protocolo de cultura com CTm e colágeno IV, com a realização dos experimentos após 7 dias.

4.5.3.a) Citometria de fluxo: Os experimentos de citometria de fluxo com a cultura de CTm e colágeno IV seguiram o protocolo descrito anteriormente.

4.5.3.b) Imunocitoquímica de CTm: As células obtidas de cultivo foram aderidas às lâminas em centrífuga tipo Cytospin (Incibrás, São Paulo, Brasil) colocando-se 200,0 µL da suspensão em cada suporte de filtro citológico e centrifugando-se por 1min a 1000 rpm. Posteriormente, foram fixadas em acetona a 4°C por 7 minutos e, após secarem, as lâminas foram transferidas para TBS. A presença dos marcadores de podócitos WT1, Nefrina, Podocina e Sinaptopodina foi estudada através da técnica de imunoperoxidase, utilizando o kit NovoLink® (Leica Novocastra, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido). Todos os bloqueios foram realizados como descrito no item 4.4.3.d.

As células foram incubadas com os anticorpos primários *mouse monoclonal* anti WT1 (Dako, Dinamarca), *rabbit polyclonal* anti nefrina (gentilmente cedido pelo Dr Lawrence B. Holzman, Universidade da Pensilvânia, Philadelphia, EUA), *rabbit polyclonal* anti Podocina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA) e *mouse monoclonal* anti Sinaptopodina (Progen Biotechnik, Heidelberg, Alemanha) diluídos respectivamente 1:50, 1:500, 1:100 e 1:800 em TBS, durante a noite, à 4°C, em câmara úmida. Controles negativos, nos quais se omitiu o anticorpo primário foram realizados em todos os casos. Para a revelação, as células foram incubadas com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), diluído em tampão substrato apropriado, fornecido pelo fabricante. A revelação foi realizada sob aumento microscópico de 100 vezes, com duração de aproximadamente 8 minutos para WT1 e Podocina, e 10 minutos para Sinaptopodina e Nefrina. A contra coloração por Hematoxilina segundo Mayer (Hemalaun, Merck, Darmstadt, Alemanha) foi realizada durante 2 minutos, para se obter maior contraste entre os compartimentos celulares. O excesso de Hemalaun foi removido por lavagem com água destilada. As lamínulas foram montadas com Glicergel (DAKO, Copenhagen, Dinamarca) previamente aquecido.

4.5.3.c) PCR em tempo real: A fim de avaliarmos uma possível indução de diferenciação de CTm em podócitos, quando cultivadas com colágeno IV, foram realizados experimentos para avaliação da expressão relativa das seguintes proteínas: WT1, nefrina, podocina e sinaptopodina. A técnica de extração do RNA, síntese de cDNA e os primers utilizados foram descritos anteriormente no item 4.4.4.

4.6. Análise estatística

A análise foi baseada na comparação de grupos, utilizando para os cálculos o software *GraphPad Prism* versão 5.01 (Graphpad Software, La Jolla, EUA). Inicialmente as diversas variáveis foram testadas para normalidade, caso as amostras apresentassem distribuição normal era aplicado ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls. Por outro lado, se a distribuição não fosse normal era aplicado o teste de Kruskal-Wallis para medianas, com pós-teste de Dunn. Quando ocorreu a eventualidade de se compararem apenas dois grupos foram utilizados o teste t de Student para amostras não pareadas, com correção de Welch quando as variâncias diferiam, ou o teste de Mann-Whitney, quando os dados eram não-paramétricos. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p era menor que 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Padronização do modelo PAN

Os resultados obtidos nas Fases I, II e III, utilizados para a padronização do modelo, constam nos Anexos A, B e C, respectivamente. Resumidamente verificou-se que a PAN foi efetiva em proporcionar proteinúria, sendo esses valores maiores nos ratos da linhagem Wistar em relação aos da linhagem Lewis. Ainda, a administração intraperitoneal da PAN não alterou o modelo, sendo que a nefrectomia unilateral acelerou a obtenção de lesões características de podocitopatia (**Anexo A; Anexo B; Anexo C**).

5.2. Obtenção de Células Tronco

5.2.1. Extração e isolamento de CTm

As células extraídas da MO apresentaram adesão às placas de cultivo depois de serem mantidas por 24 horas com meio de cultura em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As células não aderentes foram removidas da cultura depois de 72 horas de incubação através da troca de meio (**Figura 9**).

Figura 9. Fotos de cultura das CT extraídas da MO.

5.2.2. Caracterização das CTm por citometria de fluxo

Os resultados demonstraram que as células mantidas em cultura apresentaram antígenos de superfície característicos de CTm, como CD44 e CD90, sendo $61\pm 8\%$ e $85\pm 4\%$, respectivamente. Por outro lado, a expressão foi negativa, ou seja, de baixa marcação de superfície celular para CD45, CD31 e CD34, quantificadas em $3\pm 0,5\%$, $4\pm 1\%$ e $19\pm 4\%$, respectivamente. Os resultados da imonofenotipagem das CTm estão representados na figura abaixo em forma de histograma (**Figura 10**).

Figura 10. Caracterização celular de marcadores de superfície por citometria de fluxo. CTm foram positivas para CD44 e CD90 e negativas para CD31, CD34 e CD45.

5.2.3. Diferenciação *in vitro* das CTm em células osteogênicas

Sob condições apropriadas para a diferenciação celular, as CTm primárias foram capazes de se diferenciar em osteoblastos sob a ação dos estímulos específicos para este experimento (**Figura 11**).

Figura 11. Imagens das CTm após estímulo para diferenciação em células de linhagem osteogênica. **(A)** Células não coradas; **(B)** Células marcadas com fosfatase alcalina; aumento de 40x. **(C)** coloração vermelho de alizarina para visualização de calcificação (aumento de 200x).

5.2.4. Diferenciação *in vitro* das CTm em células adipogênicas

As CTm primárias foram capazes de se diferenciar em adipócitos após 21 dias sob condições de meio de cultura apropriado, como já descrito anteriormente. Ao microscópio, encontramos vacúolos lipídicos característicos (**Figura 12**).

Figura 12. Imagens das CTm após estímulo para diferenciação em células de linhagem adipogênica. **(A e B)** Observam-se a presença de vacúolos lipídicos na coloração com Oil Red (aumento de 400x).

5.3. Estudos *in vivo*

5.3.1. Infusão e identificação de CTm no órgão alvo

5.3.1.a) Padronização da infusão de CTm na região subcapsular

Foram realizados experimentos de transplante de CTm via subcapsular renal em ratos Wistar machos (**Figura 13**).

Figura 13. Inoculação de CTm sob a cápsula renal. A região delimitada indica o local exato que as células foram inoculadas.

5.3.1.b) Marcação das CTm com CM-Dil

Para localizar as CTm no tecido renal após serem inoculadas, foi realizada a marcação com CM-Dil. As células ainda em cultura foram incubadas com este marcador. A marcação é detectada por imunofluorescência (**Figura 14**).

Figura 14. Imunofluorescência das CTm marcadas com CM-Dil.
(A) aumento de 40x; (B) aumento de 100x.

5.3.1.c) Cinética celular das CTm inoculadas em região subcapsular renal

Foi analisada no tecido renal a infiltração das CTm marcadas com CM-Dil. No animal com 24 horas pós-inoculação observou-se as células na região subcapsular renal (**Figura 15A**). Após 5 dias, houve infiltração e migração dessas células para a região cortical. (**Figura 15B**). A mesma distribuição foi observada depois de 10 dias do procedimento (**Figura 15C**). Até 15 dias é possível encontrar algumas células marcadas na região medular (**Figura 15D**). Após 30 dias não é possível captar emissão de fluorescência pelas CTm (**Figura 15E**).

Figura 15. Localização e distribuição das CTm no tecido renal; **(A)** 24 horas; **(B)** 5 dias; **(C)** 10 dias; **(D)** 15 dias; **(E)** 30 dias (aumento de 400x).

5.3.2. Infusão de CTm no modelo PAN

5.3.2.a) Evolução Ponderal

O peso inicial dos animais foi semelhante em todos os grupos. No entanto, enquanto o grupo Controle manteve seu ganho ponderal esperado ao longo do tempo, nos animais dos grupos PAN e PAN+CTm o ganho de peso foi significativamente menor ($p < 0,05$) (**Figura 16; Tabela 3**).

Figura 16. Evolução ponderal dos animais durante o período do experimento.

- ^a $p < 0,05$ vs dia 0
- ^b $p < 0,05$ vs Controle dia 15
- ^c $p < 0,05$ vs Controle dia 30
- ^d $p < 0,05$ vs Controle dia 45
- ^e $p < 0,05$ vs Controle dia 60
- ^f $p < 0,05$ vs PAN dia 15
- ^g $p < 0,05$ vs PAN dia 45
- ^h $p < 0,05$ vs PAN dia 60
- ⁱ $p < 0,05$ vs PAN+CTm dia 15

Tabela 3. Peso dos animais durante o período do experimento.

Dia	Peso (gramas)				
	0	15	30	45	60
Controle	210±3	293±7	368±9 ^a	415±9 ^a	456±9 ^a
PAN	209±2	200±9 ^{b,c,d,e}	249±9 ^{c,d,e}	312±2 ^{a,f}	340±2 ^{a,e,f}
PAN + CTm	209±3	205±9 ^{c,d,e,g,h}	249±1 ^{c,d,e}	298±1 ^f	375±1 ^{a,e,f,i}

^a p<0,05 vs dia 0^b p<0,05 vs Controle dia 15^c p<0,05 vs Controle dia 30^d p<0,05 vs Controle dia 45^e p<0,05 vs Controle dia 60^f p<0,05 vs PAN dia 15^g p<0,05 vs PAN dia 45^h p<0,05 vs PAN dia 60ⁱ p<0,05 vs PAN+CTm dia 15**5.3.2.b) Pressão Caudal**

A pressão caudal no início do experimento foi semelhante em todos os grupos. Entretanto, com 30 dias, os animais do grupo PAN apresentaram um aumento significativo da pressão arterial e o tratamento com CTm não teve efeito neste parâmetro. Aos 60 dias, o grupo PAN manteve níveis elevados de pressão caudal, sendo que a terapia com CTm promoveu diminuição dos níveis pressóricos (**Figura 17; Tabela 4**).

Figura 17. Pressão caudal dos animais ao longo do período experimental.

^a $p < 0,05$ vs dia 0
^b $p < 0,05$ vs Controle dia 30
^c $p < 0,05$ vs Controle dia 60
^d $p < 0,05$ vs PAN dia 60

Tabela 4. Pressão caudal dos animais ao longo do período experimental.

	Pressão caudal (mmHg)		
Dia	0	30	60
Controle	127±1	124±3	122±1
PAN	128±1	151±4 ^{a,b}	161±5 ^{a,b}
PAN + CTm	127±2	154±3 ^{a,b,c}	143±6 ^{a,b,d}

5.3.2.c) Proteinúria

Todos os grupos iniciaram com valores semelhantes de proteinúria (**Figura 18; Tabela 5**). O grupo Controle, formado por ratos normais submetidos apenas a UniNx, apresentou um discreto, mas significativo, aumento dos níveis de proteinúria a partir do 15º dia em relação ao valor inicial, chegando no máximo, aos 60 dias, em níveis de $21,0 \pm 3,8$ mg/24h ($p < 0,05$ vs Controle dia 0). Já o grupo PAN, formado por animais submetidos a UniNx e que receberam PAN, evoluiu com aumento marcante da proteinúria, alcançando pico de proteinúria maciça aos 30 dias ($217,8 \pm 16,9$ mg/24h; $p < 0,05$ vs PAN dia 0). O tratamento com CTm foi eficaz em reduzir os níveis de proteinúria, de forma significativa aos 30 e 60 dias do estudo.

Figura 18. Proteinúria dos animais ao longo do período experimental.

- ^a $p < 0,05$ vs Controle dia 0
- ^b $p < 0,05$ vs PAN dia 0
- ^c $p < 0,05$ vs PAN+CTm dia 0
- ^d $p < 0,05$ vs PAN 30 dias
- ^e $p < 0,05$ vs PAN+CTm 30 dias
- ^f $p < 0,05$ vs PAN 60 dias

Tabela 5. Proteinúria dos animais ao longo do período experimental.

	Proteinúria (mg/24h)				
Dia	0	15	30	45	60
Controle	3,9±1,0	14,1±1,5 ^a	12,8±1,0 ^a	17,0±1,7 ^a	21,0±3,8 ^a
PAN	6,0±0,9	176,7±21,8 ^b	217,8±16,9 ^b	99,5±11,2 ^{b,d}	79,4±6,4 ^{b,d}
PAN + CTm	6,1±1,4	133,0±30,9 ^c	133,0±24,6 ^{c,d}	62,4±15,3 ^{c,e}	44,3±13,6 ^{c,e,f}

^a p<0,05 vs Controle dia 0^b p<0,05 vs PAN dia 0^c p<0,05 vs PAN+CTm dia 0^d p<0,05 vs PAN 30 dias^e p<0,05 vs PAN+CTm 30 dias^f p<0,05 vs PAN 60 dias

5.3.2.d) Albuminúria

A quantificação da albuminúria pela técnica ELISA revelou que os animais do grupo PAN apresentaram aumento significativo da excreção urinária de albumina aos 30 e 60 dias, comparados com o grupo Controle (**Figura 19; Tabela 6**). No entanto, o grupo que recebeu as CTm apresentou significativa diminuição da albuminúria em relação ao grupo PAN (**Figura 19; Tabela 6**).

Figura 19. Albuminúria dos animais no decorrer do experimento.

- ^a $p < 0,05$ vs dia 0
- ^b $p < 0,05$ vs Controle dia 30
- ^c $p < 0,05$ vs PAN dia 30
- ^d $p < 0,05$ vs Controle dia 60
- ^e $p < 0,05$ vs PAN dia 60

Tabela 6. Valores da albuminúria dos animais durante o experimento.

Dia	Albuminúria (mg/ml)		
	0	30	60
Controle	1,5±0,5	1,5±0,7	1,3±0,3
PAN	1,9±0,9	242,3±61,5 ^{a,b,d}	205,7±38,5 ^{a,b,d}
PAN + CTm	1,0±0,5	149,4±27,3 ^{a,b,c,d}	106,2±22,5 ^{a,b,c,d,e}

^a p<0,05 vs dia 0^b p<0,05 vs Controle dia 30^c p<0,05 vs PAN dia 30^d p<0,05 vs Controle dia 60^e p<0,05 vs PAN dia 60

5.3.2.e) Função renal avaliada pela uréia e creatinina sérica

Aos 30 dias, os grupos PAN e PAN+CTm apresentaram níveis de uréia e creatinina sérica significantivamente maiores em relação ao grupo Controle (**Tabela 7**). Os níveis de uréia e creatinina nos animais que receberam CTm não foi diferente dos animais do grupo PAN. No entanto, aos 60 dias, os níveis de uréia e creatinina nos animais tratados com CTm foram significantivamente menores quando comparados com os níveis obtidos aos 30 dias.

Tabela 7. Valores de uréia e creatinina sérica durante o período do estudo

	Uréia sérica (mg/dl)		Creatinina sérica (mg/dl)	
Dia	30	60	30	60
Controle	73±7	54±3	0,46±0,1	0,28±0,1
PAN	156±12 ^{a,b}	105±11 ^b	1,1±0,2 ^{a,b}	0,65±0,1 ^b
PAN + CTm	149±29 ^{a,b,d}	74±10 ^{c,e}	0,96±0,1 ^{a,b,d}	0,48±0,1 ^{c,e}

^a p<0,05 vs Controle dia 30

^b p<0,05 vs Controle dia 60

^c p<0,05 vs PAN dia 30,

^d p<0,05 vs PAN dia 60

^e p<0,05 vs PAN+CTm dia 30

5.3.2.f) Glomeruloesclerose

O modelo utilizado neste estudo, associando a indução de podocitopatia com PAN e UniNx, alcançou o objetivo de causar lesão histológica, caracterizada por esclerose glomerular, já detectada aos 30 dias de experimento (**Figura 20B; Tabela 8**), e mais acentuada aos 60 dias (**Figura 20E**). O tratamento com CTm não protegeu os animais doentes com relação ao desenvolvimento de glomerulosclerose (**Figura 20C e Figura 20F; Figura 21**).

Figura 20. Aspecto dos glomérulos nos diferentes grupos aos 30 e 60 dias (aumento de 400x).

Figura 21. Gráfico da porcentagem de glomeruloesclerose .

^a p<0,05 vs Controle dia 30

^b p<0,05 vs Controle dia 60

^c p<0,05 vs PAN dia 30

Tabela 8. Valores da quantificação de glomeruloesclerose, fibrose intersticial e da expressão de α -actina

Dia	Glomeruloesclerose (%)		Fibrose intersticial (%)		α -actina (%)	
	30	60	30	60	30	60
Controle	0,1±0,01	0,1±0,01	0,13±0,01	0,10±0,01	0,1±0,01	0,3±0,09
PAN	11,7±2,7 ^a	46,1±6,7 ^{a,b,c}	2,1±0,5 ^{a,b}	1,1±0,3 ^{a,b}	6,15±1,0 ^{a,b}	5,47±0,3 ^{a,b}
PAN + CTm	16,2±11,3 ^a	43,3±9,1 ^{a,b,c}	0,6±0,4 ^a	0,9±0,4 ^a	6,23±0,4 ^{a,b}	5,3±0,3 ^{a,b}

5.3.2.g) Fibrose Intersticial

Neste modelo, o grupo PAN apresentou aos 30 dias área de fibrose intersticial significativamente maior em relação ao grupo Controle (**Tabela 8; Figura 22B**). Embora a administração de CTm tenha promovido uma diminuição do escore aos 30 dias, esta diferença não foi estatisticamente significativa (**Figura 22C**). Resultados semelhantes foram observados aos 60 dias (**Figura 22E e Figura 22F; Figura 23**).

Figura 22. Aspecto da fibrose intersticial no rim dos animais com 30 e 60 dias (aumento de 200x).

Figura 23. Gráfico da área de fibrose intersticial nos grupos estudados.

^a $p < 0,05$ vs Controle dia 30

^b $p < 0,05$ vs Controle dia 60

5.3.2.h) Imunohistoquímica para identificação de miofibroblastos

Os miofibroblastos foram identificados por imunohistoquímica através da expressão de α -actina. O grupo PAN apresentou um aumento significativo de miofibroblastos em relação ao grupo Controle tanto aos 30 dias (**Tabela 8; Figura 24B e Figura 24C**) como aos 60 dias (**Figura 24E e Figura 24F**). Neste modelo, a infusão das CTm não induziu diferença na expressão de α -actina (**Figura 25**).

Figura 24. Expressão de α -actina através de imunohistoquímica nos diferentes grupos (aumento de 400x).

Figura 25. Quantificação da alfa actina em cada grupo nos dias 30 e 60.

^a $p < 0,05$ vs Controle dia 30

^b $p < 0,05$ vs Controle dia 60

5.3.2.i) Microscopia Eletrônica

A medida da espessura dos pedicelos foi realizada através de microscopia eletrônica, sendo os resultados expressos em nanômetros (nm). Com 30 e 60 dias o grupo Controle manteve a morfologia normal dos pedicelos, com preservação dos espaços entre as fendas diafragmáticas (**Figura 26A1 e Figura 26A2**). O grupo PAN apresentou fusão dos pedicelos e, conseqüentemente, significativo aumento da espessura em relação ao grupo Controle, sendo essas alterações ultraestruturais observadas aos 30 e 60 dias (**Figura 26B1 e Figura 26B2**). Neste modelo, a infusão de CTm induziu a diminuição da espessura dessa estrutura de modo significativo no período analisado (**Figura 26C1 e Figura 26C2; Figura 27**). Os valores da quantificação da espessura do pedicelo se encontram na **Tabela 9**.

Figura 26. (A1), (B1), (C1): Imagens da microscopia eletrônica nos diferentes grupos com 60 dias (aumento de 15000x). No detalhe é possível observar a preservação da FD e o aspecto normal do pedicelo no grupo controle **(A2)**; no grupo PAN a fusão dos pedicelos prevalece, exemplificada nos achados de maior espessura **(B2)**; e há uma melhora significativa no grupo que recebeu CTm **(C2)**.

Figura 27. Medida da espessura do pedicelo em cada grupo nos dias 30 e 60.

^a $p < 0,05$ vs Controle dia 30

^b $p < 0,05$ vs Controle dia 60

^c $p < 0,05$ vs PAN dia 30

^d $p < 0,05$ vs PAN dia 60

Tabela 9. Valores da medida da espessura do pedicelo.

Dia	Espessura do pedicelo (nm)	
	30	60
Controle	69,3±1,4	69,2±3,1
PAN	208,4±12,7 ^{a,b}	173,8±9,0 ^{a,b}
PAN+CTm	126,4±6,7 ^{a,b,c}	103,9±3,2 ^{a,b,c,d}

5.3.2.j) PCR em tempo real dos marcadores podocitários

A expressão de RNAm dos marcadores podocitários WT1, nefrina, podocina, sinaptopodina e podocalixina utilizados durante o experimento, foi expressa em relação a β -actina, utilizando-se como referência os valores encontrados no grupo Controle (**Figura 28; Tabela 10**). Neste modelo, pode ser comprovado que os animais do grupo PAN apresentaram uma marcante diminuição da expressão relativa destes marcadores aos 30 e 60 dias. A terapia com CTm neste modelo induziu melhora significativa da expressão de WT1 (**Figura 28A**) e melhora parcial de nefrina (**Figura 28B**), podocina (**Figura 28C**) e sinaptopodina (**Figura 28D**) no período analisado. Não houve diferença na expressão relativa de podocalixina entre os grupos (**Figura 28E**).

Figura 28. Representação gráfica da expressão de RNAm dos marcadores podocitários.

* $p < 0.05$ vs. Controle

$p < 0.05$ vs. PAN

Tabela 10. Valores da expressão relativa de RNAm dos marcadores podocitários.

	WT1		NEFRINA		SINAPTOPODINA		PODOCINA		PODOCALIXINA	
Dia	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
Controle	1,0±0,32	1,0±0,13	1,0±0,11	1,0±0,15	1,0±0,03	1,0±0,21	1,0±0,10	1,0±0,24	1,0±0,13	1,0±0,16
PAN	0,09±0,18*	0,14±0,25*	0,47±0,22	0,10±0,2*	0,33±0,17*	0,28±0,36	0,17±0,2*	0,10±0,28*	0,72±0,12	0,53±0,27
PAN+CTm	0,42±0,21	0,86±0,23 [#]	0,58±0,2	0,32±0,31	0,79±0,21	0,87±0,33	0,76±0,23	0,83±0,29	0,82±0,42	0,91±0,27

* p<0,05 vs. Controle

[#] p<0,05 vs. PAN

5.3.2.I) Imunohistoquímica para identificação de podócitos

Para identificar podócitos foram realizados experimentos de imunohistoquímica utilizando-se o marcador WT1. Aos 30 e 60 dias, no grupo PAN, houve uma diminuição significativa da área marcada para WT1 (**Figura 29B e Figura 29E**) em relação ao grupo Controle (**Figura 29A e Figura 29D**), refletindo diminuição do número de podócitos. A administração de CTm foi capaz de melhorar a expressão de WT1 de maneira significativa no período analisado (**Figura 29C e Figura 29F; Figura 30**).

Figura 29. Expressão de WT1 através de imunohistoquímica nos diferentes grupos (aumento de 400x).

Figura 30. Porcentagem de área marcada da expressão de WT1 em cada grupo com 30 e 60 dias.

^a $p < 0,05$ vs Controle dia 30
^b $p < 0,05$ vs Controle dia 60
^c $p < 0,05$ vs PAN dia 30
^d $p < 0,05$ vs PAN+CTm dia 30
^e $p < 0,05$ vs PAN dia 60

Tabela 11. Valores da expressão de WT1 nos grupos experimentais.

Dia	Expressão de WT1 (%)	
	30	60
Controle	5,7±0,3	2,42±0,1 ^{a,c,d}
PAN	3,3±0,2 ^{a,b}	1,45±0,1 ^{a,b,c,d}
PAN+CTm	5,0±0,2 ^{a,b,c}	2,0±0,1 ^{a,c,d,e}

Os experimentos de imunohistoquímica para nefrina (**Figura 31**) e sinaptopodina (**Figura 32**) foram realizados para ilustrar os resultados do qPCR e não foram quantificados.

Figura 31. Expressão de nefrina através de imunohistoquímica nos diferentes grupos (aumento de 400x).

Figura 32. Expressão de sinaptopodina através de imunohistoquímica nos diferentes grupos (aumento de 400x).

5.3.2.m) *PCR em tempo real de citocinas*

A análise da expressão de RNAm das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10 foram também expressas em relação à β -actina, utilizando-se como referência os valores encontrados no grupo Controle (**Figura 33; Tabela 12**). Aos 60 dias, os resultados mostram que as CTm induziram, de forma significativa, uma diminuição das interleucinas pró-inflamatórias (**Figura 33A e Figura 33B**) e aumento das interleucinas anti-inflamatórias (**Figura 33C e Figura 33D**) neste modelo.

Figura 33. Representação gráfica da expressão de RNAm das citocinas inflamatórias.

* $p < 0,05$ vs Controle

$p < 0,05$ vs PAN

5.3.2.n) PCR em tempo real do VEGF

A análise da expressão de RNAm do VEGF foi expressa em relação à β -actina, utilizando-se como referência os valores encontrados no grupo Controle. Com 60 dias, o tratamento com CTm recuperou a expressão de VEGF em comparação com o grupo PAN ($p < 0.05$; **Figura 34; Tabela 12**).

Figura 34. Representação gráfica da expressão de mRNA do VEGF.

* $p < 0,05$ vs Controle

$p < 0,05$ vs PAN

Tabela 12. Valores da expressão relativa de RNAm das citocinas inflamatórias e do VEGF.

	IL-1 β		TNF- α		IL-4		IL-10		VEGF	
Dia	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
Controle	1,0 $\pm$ 0,17	1,0 $\pm$ 0,22	1,0 $\pm$ 0,22	1,0 $\pm$ 0,37	1,0 $\pm$ 0,14	1,0 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,16	1,0 $\pm$ 0,21	1,0 $\pm$ 0,28	1,0 $\pm$ 0,13
PAN	1,58 $\pm$ 0,19	3,53 $\pm$ 0,21*	1,28 $\pm$ 0,27	2,31 $\pm$ 0,2*	0,12 $\pm$ 0,18*	0,18 $\pm$ 0,11*	1,47 $\pm$ 0,19	3,77 $\pm$ 0,19*	0,60 $\pm$ 0,15	0,39 $\pm$ 0,20*
PAN+CTm	1,11 $\pm$ 0,2	2,44 $\pm$ 0,32* [#]	1,05 $\pm$ 0,45	1,44 $\pm$ 0,39 [#]	0,09 $\pm$ 0,03*	1,34 $\pm$ 0,22 [#]	2,1 $\pm$ 0,21*	5,25 $\pm$ 0,32* [#]	0,85 $\pm$ 0,18	0,99 $\pm$ 0,18 [#]

* p<0.05 vs. Controle

[#] p<0.05 vs. PAN

5.3.2.o) Imunohistoquímica para atividade de proliferação

Os experimentos de imunohistoquímica para PCNA foram realizados para identificar células em atividade proliferativa. Aos 30 e 60 dias o grupo PAN apresentou aumento significativo do número de células em proliferação (**Figura 35B e Figura 35E**) em relação ao grupo Controle (**Figura 35A e Figura 35D**). Neste modelo, a terapia com CTm (**Figura 35C e Figura 35F**) induziu aumento do número de células PCNA⁺ em comparação ao grupo PAN, com predomínio em região tubular, durante o período analisado (**Tabela 13**).

Figura 35. Expressão de PCNA através de imunohistoquímica nos diferentes grupos (aumento de 400x).

5.3.2.p) Imunohistoquímica para identificação de macrófagos

A identificação de macrófagos, através da expressão de ED1, mostrou um aumento significativo no grupo PAN (**Figura 36B e Figura 36E**) e no grupo PAN+CTm (**Figura 36C e Figura 36F**) em comparação com o grupo Controle (**Figura 36A e Figura 36D**), aos 30 e 60 dias. A infusão de CTm não influenciou de forma significativa a expressão deste componente celular (**Tabela 13**).

Figura 36. Expressão de ED1 através de imunohistoquímica nos diferentes grupos (aumento de 400x).

5.3.2.q) Imunohistoquímica para identificação de linfócitos-T

A imunohistoquímica para CD43 foi realizada para a caracterização de linfócitos-T. Embora os grupos PAN (**Figura 37B e Figura 37E**) e PAN+CTm (**Figura 37C e Figura 37F**) tenham apresentado aumento na expressão de CD43 em relação ao grupo Controle (**Figura 37A e Figura 37D**), tanto aos 30 quanto aos 60 dias, esta diferença não foi significativa. Também não houve diferença na quantificação de linfócitos-T entre os grupos PAN e PAN+CTm no período do experimento (**Tabela 13**).

Figura 37. Expressão de CD43 através de imunohistoquímica nos diferentes grupos (aumento de 400x).

Tabela 13 . Valores da expressão de PCNA, ED1 e CD43 obtidos através de imunohistoquímica.

	PCNA (atividade proliferativa) (cels/mm ²)		ED1 (macrófagos) (cels/mm ²)		CD43 (células-T) (cels/mm ²)	
Dia	30	60	30	60	30	60
Controle	6,4±2,9	1,6±0,4	115±29	26±20	68±16	84±17
PAN	11,3±1,8*	5,7±0,7*	491±353*	341±356*	81±15	181±95
PAN+CTm	16,5±1,3* [#]	11,±3,1* [#]	426±245*	245±114*	64±14	140±69

* p<0,05 vs Controle

[#] p<0,05 vs grupo PAN

5.4. Estudos *in vitro*

5.4.1. Isolamento e cultivo de glomérulos

Os glomérulos extraídos do córtex renal aderiram à placa após 6 horas de cultivo. Observou-se que as características morfológicas dos glomérulos permanecem até 30 dias (**Figura 38**).

Figura 38. Aspecto dos glomérulos em cultura após 2 (**A**), 7 (**B**), 15 (**C**) e 30 dias (**D**) (aumento de 400x) .

5.4.2. Imunocitoquímica de glomérulos

A expressão de WT1 foi realizada no 7º e 15º dia de cultivo. Observou-se a ocorrência de marcação inespecífica de todo o glomérulo, dificultando a identificação dos podócitos (**Figura 39**).

Figura 39. Aspecto da imunocitoquímica dos glomérulos cultivados por 7 **(A)** e 15 dias **(B)** (aumento de 400x).

5.4.3. Cocultura de CTm e glomérulos

5.4.3.a) Cocultura por 10 dias

Aspecto morfológico das células: Morfologicamente o aspecto das CTm cultivadas isoladamente apresentaram capacidade de aderência celular já no 3º dia, com morfologia fibroblastóide e intensa proliferação e crescimento em colônia. Os glomérulos apresentaram as mesmas características descritas anteriormente (item IV.3.2). Ao cultivar as CTm com glomérulos foi observado uma intensa proliferação das CTm ao redor dos glomérulos, sem perda das suas características morfológicas (**Figura 40**).

Figura 40. Fotos representativas da cocultura de CTm e glomérulos até 10 dias.

Análise dos marcadores de superfície celular: A análise dos marcadores de superfície celular foi realizada nas culturas de CTm cultivadas isoladamente e também na cocultura de CTm com glomérulos. O grupo CTm apresentou intensa positividade para CD29 e CD44 e foram negativas para CD31, CD34, CD45, CD117 e CD133, confirmando que essas células eram predominantemente CTm. O mesmo foi observado no grupo CTm + glomérulos, demonstrando que o cultivo dos glomérulos não influenciou na expressão de marcadores das CTm nos diferentes dias de cultura (**Tabela 14**).

Tabela 14. Painel dos marcadores de superfície celular em CTm e CTm + glomérulos até 10 dias.

Marcadores	Período	1° dia		3° dia		5° dia		7° dia		10° dia	
	Grupos	CTm	CTm + Glom	CTm	CTm + Glom	CTm	CTm + Glom	CTm	CTm + Glom	CTm	CTm + Glom
Isótopo	IgG	1,0	1,6	0,1	0,7	0,8	0,9	0,1	0,1	0,8	0,3
CTm	CD29	98,9	98,7	99,9	99,7	95,4	98,5	99,7	99,4	99,0	99,2
	CD44	99,4	99,5	99,8	99,9	98,2	99,7	99,8	99,6	99,4	99,8
CTh	CD34	1,3	0,6	5,6	8,3	1,6	0,2	3,3	0,1	0,1	0,3
	CD117	-	-	-	-	0,6	0,6	0,1	1,6	0,6	0,6
CT Progen. endot.	CD133	2,2	6,6	1,6	1,1	0,3	0,5	2,5	0,5	0,1	0,1
Cel. endot.	CD31	0,4	1,1	1,1	11,9	0,8	0,1	11,8	1,6	0,1	0,3
Leucócitos	CD45	-	-	-	-	0,2	0,3	0,4	0,8	3,6	0,9

5.4.3.b) Cocultura por 14 dias

Aspecto morfológico das células: Ao cultivar as CTm com glomérulos por até 14 dias, foi observado uma intensa proliferação destas células ao redor dos glomérulos, porém sem perda das suas características morfológicas (Figura 41).

Figura 41. Fotos representativas da cocultura de CTm e Glomérulos após 14 dias.

Análise dos marcadores de superfície celular: A análise dos marcadores de superfície celular também foi realizado na cocultura de 14 dias, não havendo diferença em relação aos experimentos de 10 dias. O grupo CTm apresentou intensa positividade para CD90 e CD44 e foram negativas para CD31 e CD45, mesmo padrão observado no grupo CTm+glomérulos, demonstrando que o cultivo dos glomérulos não influenciou na expressão de marcadores das CTm nos diferentes dias de cultura (**Tabela 15**).

Tabela 15. Painel dos marcadores de superfície celular em CTm e CTm+glomérulos até 14 dias.

Marcadores	Período	Pré	7° dia		14° dia	
	Grupos	CTm	CTm	CTm + Glom	CTm	CTm + Glom
Isótopo	IgG	0,8	0,33	1,17	0,22	0,26
CTm	CD90	92,5	89,2	89,7	73,3	81,5
	CD44	76,0	99,2	99,2	86,3	88,7
Cel. endot.	CD31	0,09	0,35	0,29	0,16	0,14
Leucócitos	CD45	1,31	0,8	0,7	0,20	0,94

5.4.4. Cultura de CTm com colágeno IV

5.4.4.a) Aspecto morfológico das células

Morfologicamente o aspecto das CTm cultivadas apresentaram capacidade de aderência celular já no 3º dia com morfologia fibroblastóide e intensa proliferação e crescimento em colônia. No 7º dia de experimento foi observado menor proliferação na placa com colágeno, sem diferença na morfologia das células (**Figura 42**).

Figura 42. Aspecto morfológico das CTm cultivadas sem e com colágeno IV, de acordo com o dia de experimento; aumento de 40x.

5.4.4.b) Citometria de fluxo

A análise dos marcadores de superfície celular foi realizada nas culturas de CTm cultivadas sem e com colágeno IV. Ambos os grupos apresentaram positividade para CD90 e CD44 e foram negativos para CD31 e CD45, indicando que essas células mantiveram suas características de CTm e que, a princípio, o colágeno IV não propiciou alterações significativas (**Tabela 16**) (**Figura 43**).

Tabela 16. Painel dos marcadores de superfície celular em CTm e CTm + colágeno IV.

Marcadores	Período	7º dia	
	Grupos	CTm	CTm + Colág
Isótopo	IgG	0,29	0,58
CTm	CD90	94,01	98,79
	CD44	87,63	97,96
Cél. endot.	CD31	0,13	0,08
Leucócitos	CD45	5,86	0,05

Figura 43. Histograma dos marcadores de superfície celular.

5.4.4.c) Imunocitoquímica**WT1**

Figura 44. Imunocitoquímica do marcador podocitário WT1. É possível observar marcação discretamente mais intensa nas CTm cultivadas com colágeno IV em relação as cultivadas sem colágeno, principalmente em região nuclear, sem diferença na morfologia celular.

Nefrina

Figura 45. Imunocitoquímica da proteína de fenda diafragmática Nefrina. A marcação é discretamente mais intensa nas CTm cultivadas com colágeno IV, em relação às cultivadas sem colágeno, principalmente em região nuclear, mas também em citoplasma. Não há diferença morfológica entre as células.

Podocina

Figura 46. Imunocitoquímica da proteína de fenda diafragmática Podocina. A marcação é discretamente mais intensa nas CTm cultivadas com colágeno IV em relação às cultivadas sem colágeno, principalmente em região nuclear.

Sinaptopodina

Figura 47. Imunocitoquímica da proteína podocitária Sinaptopodina. A marcação é discretamente mais intensa nas CTm cultivadas com colágeno IV em relação às cultivadas sem colágeno, principalmente em região citoplasmática.

5.4.4.d) PCR em tempo real dos marcadores podocitários

A análise da expressão de RNAm dos marcadores podocitários foi expressa em relação a β -actina, utilizando-se como referência os valores encontrados em glomérulos isolados normais, não representados nos gráficos abaixo (Figura 48; Tabela 17).

Figura 48. Representação gráfica da expressão de RNAm dos marcadores podocitários.

Tabela 17. Valor da expressão relativa de RNAm dos marcadores podocitários na cultura de Ctm e CTm+colágeno IV.

	Glomérulo	CTm	CTm + colágeno IV
Nefrina	1,0±0,30	$1 \times 10^{-4} \pm 0,9 \times 10^{-4*}$	$2,82 \times 10^{-4} \pm 0,6 \times 10^{-4*}$
Podocina	1,0±0,32	$9 \times 10^{-4} \pm 0,8 \cdot 10^{-4*}$	$32 \times 10^{-4} \pm 0,10 \times 10^{-4*}$
WT1	1,0±0,21	$0,3 \times 10^{-4} \pm 0,2 \cdot 10^{-4*}$	$0,38 \times 10^{-4} \pm 0,3 \times 10^{-4*}$
Sinaptopodina	1,0±0,10	$0,001 \times 10^{-4} \pm 0,01 \cdot 10^{-4*}$	$0,005 \times 10^{-4} \pm 0,001 \times 10^{-4*}$

* p<0,05 vs Glomérulo

6. RESUMO DOS RESULTADOS

- O modelo experimental de nefropatia crônica por lesão de podócitos foi estabelecido associando-se a administração de PAN com UniNx, que promoveu proteinúria, hipertensão arterial, lesão histológica renal e fusão de pedicelos à microscopia eletrônica.
- A inoculação de CTm no modelo de nefropatia crônica por lesão de podócitos promoveu melhora significativa da pressão arterial aos 60 dias e melhora significativa da proteinúria e da albuminúria aos 30 e 60 dias.
- A inoculação de CTm no modelo de nefropatia crônica por lesão de podócitos não promoveu melhora da creatinina e uréia sérica, dos índices de glomeruloesclerose e fibrose intersticial, assim como do número de miofibroblastos.
- A microscopia eletrônica mostrou significativa diminuição da fusão dos pedicelos no grupo tratado com CTm, aos 30 e 60 dias, em relação ao grupo PAN, assim como a expressão gênica de proteínas podocitárias analisadas por qPCR e a expressão proteica de WT1 analisada por imunohistoquímica.
- No modelo de nefropatia crônica por lesão de podócitos, a infusão de CTm induziu menor expressão relativa de TNF α e IL-1 β , assim como

maior expressão de IL-4, IL-10 e VEGF (analisadas por qPCR) aos 60 dias.

- A administração de CTm também induziu atividade proliferativa renal, detectada pela significativa expressão aumentada de PCNA no modelo de nefropatia crônica por lesão de podócitos, tanto aos 30 como 60 dias. As CTm não influenciaram no número de macrófagos e linfócitos.
- A cocultura de CTm e glomérulos não induziu mudança nos marcadores de superfície celular das CTm.
- A adição de colágeno IV na cultura de CTm não induziu diferenciação celular em podócitos, visto que a análise por citometria de fluxo manteve as mesmas características dos marcadores de superfície celular. Além disso, a imunocitoquímica e o qPCR de marcadores podocitários não mostraram diferença entre os grupos.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo principal analisar o efeito da infusão de CTm em modelo experimental de nefropatia crônica. Mais especificamente, analisar se a terapia celular é capaz de induzir renoproteção em um modelo de podocitopatia induzida por PAN, visando ser considerada uma possível alternativa futura para o tratamento das glomerulopatias.

O objetivo de induzir um modelo experimental de podocitopatia em ratos foi alcançado com sucesso, caracterizado por proteinúria maciça e moderada cronicidade, mimetizando a situação clínica de pacientes portadores de podocitopatia. Para o estabelecimento deste modelo foram necessários inúmeros experimentos para padronização. Inicialmente, foi comprovada a eficácia da PAN em promover proteinúria, com dose única administrada via EV, com pico de proteinúria após 15 dias. O efeito da PAN quando aplicada uma única vez é transitório, havendo uma diminuição nos níveis da proteinúria após o pico, com discreta alteração dos índices de glomeruloesclerose e fibrose intersticial, sendo o padrão da lesão semelhante ao de lesões mínimas (Anderson et al, 1988). Como na ocasião dos experimentos iniciais houve um problema no fornecimento de ratos da linhagem Wistar pelo biotério central da FMUSP, foram realizados experimentos comparativos com animais da linhagem Lewis. Os níveis de

proteinúria nestes animais foram menores que os verificados nos ratos Wistar e com a normalização do fornecimento e maior facilidade de obtenção de ratos Wistar, o estudo prosseguiu com esta linhagem. A fim de se obter lesões histológicas mais proeminentes, pois como descrito anteriormente, a toxicidade da PAN é transitória, uma nova fase de padronização foi iniciada, testando-se doses adicionais de PAN associadas à nefrectomia unilateral (Glasser et al, 1977). A combinação da sobrecarga de filtração glomerular no rim remanescente com lesões glomerulares induzidas por duas doses de PAN permitiu a obtenção de um modelo com níveis elevados de proteinúria, com valores 10 vezes superiores aos do grupo Controle, como também o estabelecimento de lesões morfológicas mais significativas, e comparativamente, com menor mortalidade em relação aos animais que receberam três doses dessa droga. Ainda nessa fase, comprovamos que a administração IP foi tão efetiva quanto à infusão EV.

O isolamento das CTm derivadas de MO já estava padronizado no laboratório, sendo realizado por aderência da cultura celular na superfície plástica das placas de cultura. Para a obtenção de uma população rica em CTm para administração terapêutica nos animais, houve necessidade de um tempo prolongado de cultura, com constante e trabalhosa manutenção. A caracterização das CTm foi feita através de citometria de fluxo, com o uso combinado de marcadores de superfície e a exclusão de outros, pois não há um marcador específico para determinar a população celular de CTm. Estas células apresentaram baixa expressão de CTh (CD34), células leucocitárias (CD45) e células endoteliais (CD31), com maior expressão de CD44 e

CD90, comprovando o padrão mesenquimal. Existem outros marcadores para a caracterização de CTm, como CD29, CD73, CD105 e que eventualmente podem ser utilizados (Minguell et al, 2001). É possível que muitos subtipos de CTm ligeiramente diferentes existam e que seu fenótipo final seja condicionado pelos estímulos e meio de cultivo empregados (Otto et al, 2011).

A análise das células por citometria de fluxo foi feita a cada passagem, e esta caracterização mostrou que na quarta passagem a cultura de CT apresentava-se com predomínio de população de CTm e menor contaminação por outros tipos celulares.

Além dos marcadores de superfície, as CTm mantiveram a sua capacidade de diferenciação *in vitro*. As CTm isoladas de MO quando expostas a condições favoráveis e estímulos específicos foram capazes de se diferenciar em linhagem osteogênica e adipogênica, confirmando o padrão mesenquimal. Essas células também são capazes de se diferenciar em outros tipos de tecidos, e de acordo com a composição do meio de cultura, apresentam características de condrócitos, hepatócitos, células do tecido nervoso, entre outros (Verfaillie, 2002; Pittenger et al 1999). Esse conjunto de características asseguraram que as células utilizadas nos experimentos eram de fato CTm.

A infusão das CTm na região subcapsular renal foi escolhida a fim de maximizar a presença destas células no local mais próximo da lesão, evitando possível dispersão para outros órgãos ao se optar pela injeção

sistêmica. Estudo prévio em modelo de mesangiólise, induzido por anti-Thy-1 em ratos receptores de transplante de MO intravenoso, demonstrou que somente 11-12% das células encontradas nos glomérulos recuperados pós-mesangiólise eram derivadas da MO (Ito et al, 2001). Independente do mecanismo predominante de renoproteção induzida pela inoculação de CTm, é atrativa a hipótese de que um maior número de células o mais próximo possível do local lesionado, propicie uma interação mais duradoura com o órgão atingido, o que poderia ser importante para que essas células desempenhassem um possível efeito protetor. Estudo comparativo de vias de infusão foi realizado em modelo de lesão renal aguda induzida por cisplatina e demonstrou um ganho funcional com a inoculação de CT na região subcapsular, em relação à administração pela artéria renal. Além disso, as células puderam ser localizadas na região córtico-medular renal, resultado não observado com a infusão sistêmica (Kinomura et al, 2008). No presente estudo também foi mostrado que a infusão subcapsular permitiu a permanência das CTm no rim, sendo possível documentar o tráfego destas células para o parênquima renal, já observado com 5 dias após a inoculação e detectado até o 15º dia. Esta interessante capacidade de migração das CTm através do tecido renal já havia sido demonstrada anteriormente por nosso grupo, em estudo utilizando modelo experimental de ablação renal 5/6 com administração de CTm na região subcapsular (Cavaglieri et al, 2009). Esta característica pode estar relacionada com a presença do receptor de superfície celular CD44, um proteoglicano expresso nas CTm e envolvido na regulação da proliferação celular, diferenciação e migração. Foi observado

em modelo de lesão renal aguda, que CTm provenientes de camundongos *knockout* para CD44 perderam a capacidade de migrar para o local da lesão, o que também é influenciado por interação positiva dessa molécula com o ácido hialurônico (Herrera et al, 2007).

Com relação aos parâmetros clínicos analisados, os resultados referentes à pressão arterial obtidos com a infusão de CTm devem ser ressaltados. Apesar das limitações no método de pletismografia de cauda, tais como ausência do monitoramento do ciclo sono-vigília, obtenção exclusiva do valor sistólico e necessidade de aquecimento e restrição dos animais, os níveis significativamente menores da pressão arterial dos animais que receberam as CTm é surpreendente. Estudos com CT em modelos de nefropatia crônica correlacionaram os menores níveis pressóricos observados com a melhora obtida nos índices de glomeruloesclerose e de fibrose intersticial (Cavaglieri et al, 2009; van Koppen et al, 2012). Estes resultados estimulam a idéia de um efeito hemodinâmico benéfico independente propiciado pelas CTm, possivelmente relacionado à liberação de mediadores locais.

O papel do sistema renina-angiotensina, dentro desse contexto, também deve ser enfatizado visto que a angiotensina II, entre outras características, pode afetar a proliferação e diferenciação das CTm, principalmente das originadas da MO (Durik et al, 2012). Mais recentemente, Sedrakyan et al (2012) demonstraram que podócitos cultivados com angiotensina II expressavam altos níveis do receptor de angiotensina II, e a associação de losartan, como esperado, causava diminuição da expressão desse receptor.

Ao acrescentar CT de líquido amniótico, os podócitos expressaram o receptor de angiotensina II em níveis semelhantes aos observados em podócitos tratados com losartan, sugerindo que as CT também atuam na regulação da expressão desses receptores. Portanto, as CT antagonizariam a angiotensina II, favorecendo a sobrevida podocitária e influenciando a regulação do sistema renina-angiotensina. Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos que envolvem as CTm e seu possível efeito nas vias de regulação da pressão arterial devem ser estimulados.

O impacto positivo da infusão das CTm sobre a proteinúria, com redução de 40% dos valores aos 30 dias e 45% aos 60 dias, em comparação ao grupo PAN, foi um dos principais resultados do presente estudo. Valores semelhantes foram observados na dosagem da albuminúria pela técnica ELISA. Estes achados são importantes, pois a proteinúria é um dos principais fatores de prognóstico para a progressão das doenças renais. A redução de 50% da proteinúria em pacientes não diabéticos diminui significativamente a chance de queda da filtração glomerular e a necessidade de terapia renal substitutiva, assim como a evolução para óbito (Hou et al, 2007). Em pacientes com podocitopatias os resultados são semelhantes, sendo que os portadores de GESF que permanecem proteinúricos, a despeito do tratamento instituído, apresentam sobrevida renal de 33% em 10 anos (Chun et al, 2004). Além dos desfechos desfavoráveis em relação ao rim, estudos demonstram que a proteinúria está independentemente associada com aterosclerose, hipertrofia de ventrículo esquerdo (Kramer et al, 2005), arterioloesclerose (Upadhyay et

al,2009), e consequentemente com maior mortalidade (Hillege et al, 2002). Estudo experimental em modelo de glomerulonefrite anti-Thy 1.1 também mostrou o papel protetor das CTm na redução da proteinúria (Kunter et al, 2006). Já em outro modelo de podocitopatia desenvolvido em ratos, utilizando-se adriamicina, a infusão de CTm não melhorou a proteinúria (Magnasco et al, 2008). Um aspecto interessante do presente estudo foi o aumento discreto, mas significativo da proteinúria no grupo Controle em relação aos valores basais, cuja explicação está no fato de que esses animais foram submetidos à nefrectomia unilateral, e provavelmente os resultados reflitam a hiperfiltração e sobrecarga sofrida pelo rim remanescente.

Apesar das CTm terem sido efetivas como tratamento da proteinúria e da pressão arterial no modelo estudado, o efeito na função renal não aconteceu em paralelo. Doses adicionais de CTm, e consequentemente um maior número de células, poderiam ter um impacto maior na melhora dos achados histológicos. No modelo de ablação 5/6, a administração seriada de CTm (com 2×10^5 células) em intervalos de 15 dias, totalizando três aplicações, induziu melhora da função renal e diminuição da glomeruloesclerose e fibrose intersticial após 8 semanas (Semedo et al, 2009). No mesmo estudo, animais que receberam somente uma aplicação de CTm não apresentaram melhora da função renal após 12 semanas, embora o compartimento intersticial tenha melhorado em relação aos animais sem tratamento. Além de aplicações seguidas de CTm, o número de células infundidas também se relaciona com melhores resultados histológicos, sendo a variação na

literatura entre 2×10^5 e 2×10^6 células por aplicação em modelos de DRC (Caldas et al, 2011).

Entretanto, ao analisar os achados da microscopia eletrônica no presente estudo, as diferenças observadas nos valores de proteinúria se justificam. A discreta proteinúria encontrada no grupo Controle não parece estar relacionada à alteração da morfologia podocitária, pois foram observados nesse grupo pedicelos preservados e integridade dos espaços diafragmáticos. Nos animais expostos à PAN por outro lado, evidenciaram-se lesões características de podocitopatias, com fusão dos pedicelos. Nesses casos o citoesqueleto de actina se condensa em uma faixa estreita, refletindo na perda da arquitetura tridimensional normal da fenda diafragmática, com disfunção da barreira de filtração glomerular e proteinúria. A medida da espessura do pedicelo neste grupo mostrou um valor significativamente maior em relação ao grupo Controle, tanto com 30 quanto com 60 dias. Interessantemente, a infusão das CTm foi capaz de diminuir de maneira significativa a fusão dos pedicelos neste período, condizente com os menores níveis de proteinúria observados. No modelo de lesões mínimas utilizando-se a PAN, foi observado que 10 dias após a infusão de CTm houve melhora significativa dos achados histológicos à microscopia eletrônica, com melhora na estrutura dos pedicelos (Yang et al, 2010). Assim, embora o efeito positivo das CTm não se comprovou na histologia, a análise por microscopia eletrônica evidenciou melhora ultraestrutural desta célula.

Para avançar na compreensão dos efeitos benéficos da infusão de CTm neste modelo de podocitopatia, também foi analisado o nível de expressão relativo das proteínas podocitárias. Para melhor correlacionar com a estrutura do podócito, os experimentos foram realizados com proteínas de diferentes domínios desta célula. Analisou-se a expressão relativa do WT1, fator de transcrição expresso em podócitos maduros e imaturos, considerado um marcador podocitário específico, pois só estas células o expressam no glomérulo. Como esperado, observou-se que a PAN promoveu uma diminuição significativa na expressão relativa desta proteína em relação ao grupo Controle. A terapia celular foi capaz de recuperar a expressão relativa do WT1 no período analisado, com aumento significativo aos 60 dias. Corroborando esses resultados, a análise por imunohistoquímica mostrou maior expressão de WT1 nos grupos que receberam a terapia celular em comparação ao grupo PAN, sendo esta diferença observada com 30 e 60 dias. Os resultados evidenciam que a CTm exerceu um efeito de proteção na podocitopatia induzida pela PAN, com significativo “*upregulation*” deste marcador podocitário. Resultado semelhante foi descrito recentemente em modelo experimental de podocitopatia induzido por adriamicina, em que aplicações seriadas de CTm foram capazes de melhorar a expressão de WT1 (Zoja et al, 2012).

No presente estudo, foram também analisadas duas proteínas constituintes importantes da fenda diafragmática, a nefrina e a podocina. Houve uma tendência de restabelecimento da expressão relativa desses genes no tecido renal, mais especificamente da podocina, embora a melhora propiciada pela

infusão das CTm não tenha atingido níveis significativos. Infelizmente, nestes casos, a resposta à infusão de CTm foi mais heterogênea do que o esperado, o que prejudicou nossa análise estatística. A localização por imunohistoquímica da nefrina nos glomérulos, também mostrou que a infusão das CTm foi eficiente em recuperar essas proteínas nos podócitos. Embora não quantificado, o perfil ilustra os valores encontrados na expressão relativa dessas proteínas. Em um estudo com infusão de CTm no modelo de lesões mínimas induzido por PAN, a expressão de nefrina também apresentou melhora (Yang et al, 2010). Ainda, o mesmo estudo citado anteriormente, com o uso de CTm no modelo de adriamicina, também mostrou uma melhora parcial da expressão de nefrina (Zoja et al, 2012).

A expressão da sinaptopodina também foi analisada, sendo essa uma das principais proteínas componentes do citoesqueleto podocitário e intimamente ligada à actina, com papel fundamental na manutenção da forma do pedicelo. A infusão de CTm promoveu um aumento nos níveis de expressão relativa da proteína, e mais uma vez as variações individuais dentro do grupo impediram atingir um grau de significância estatística. Semelhante à nefrina, foi observado através de imunohistoquímica que a infusão das CTm foi eficiente em recuperar a expressão de sinaptopodina nos glomérulos. O efeito protetor das CTm sobre a expressão de sinaptopodina foi avaliado em estudos *in vitro* de cultura de podócitos expostos ao TGF- β 1. Segundo os autores, as CTm foram capazes de proteger os podócitos ao induzirem maior expressão de sinaptopodina (Chang et al, 2012).

A análise da expressão relativa da podocalixina não mostrou diferença entre os grupos, e sendo essa uma proteína do domínio apical do pedicelo, a hipótese é de que nesse modelo as proteínas constituintes dessa porção celular não sofreram alterações significativas. Até o momento, não há relatos na literatura analisando a relação entre CTm e a podocalixina.

Os resultados do presente estudo fornecem fortes evidências que o podócito é o alvo da ação das CTm no modelo de podocitopatia induzido pela PAN, mais especificamente as proteínas da fenda diafragmática e do corpo celular, possivelmente contribuindo para a melhora da proteinúria observada nesses animais.

A compreensão dos mecanismos envolvidos na ação das CTm nas doenças renais têm motivado inúmeros experimentos na literatura. Inicialmente foi descrita a possibilidade de fusão ou transdiferenciação dessas células com outras células residentes, como células epiteliais tubulares em modelos de insuficiência renal aguda (Morigi et al, 2004; Herrera et al, 2004b). Porém, em trabalho posterior utilizando células de medula óssea, ficou evidente que só uma pequena porcentagem das células inoculadas fora incorporada pelos túbulos lesados após isquemia e reperfusão (Lin et al, 2005). Utilizando o mesmo modelo, evidenciou-se que não seria possível uma transdiferenciação ou mesmo fusão das CTm com células tubulares, e que o benefício observado inicialmente foi provavelmente decorrente dos efeitos imunomodulatórios dessas células (Tögel et al, 2005). A pouca frequência com que esses processos foram observados indica que os mesmos talvez

tenham relevância limitada para a reparação tecidual renal em modelos *in vivo*, e que provavelmente é a geração de um ambiente favorável à proliferação de células epiteliais desdiferenciadas, sobreviventes ao episódio de lesão, que prevalece sobre uma possível transdiferenciação direta de CTm em tecido renal funcionante (Tögel et al, 2012).

Outra possibilidade é a de que CT residentes no próprio tecido renal participem do processo de regeneração. O isolamento e a caracterização de uma população de células renais de ratos adultos que tinham capacidade de se renovar em cultura, expressavam marcadores de CTm (CD90, CD44), e de pluripotência (Oct4) mas não expressavam citoqueratina, estimulou essa hipótese (Gupta et al, 2006). Os autores denominaram estas células multipotentes de células progenitoras renais, e no mesmo ano pesquisadores italianos localizaram em rins humanos, mais especificamente no epitélio parietal da cápsula de Bowman, células progenitoras renais caracterizadas pela positividade dos marcadores de superfície endotelial CD24 (marcador de CT humana) e CD133 (marcador de CT hematopoiética) que poderiam ser induzidas *in vitro* a expressar marcadores proximais e distais de células tubulares renais, osteócitos, adipócitos e neurônios (Sagrinati et al, 2006). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou através de experimentos *in vitro* e *in vivo*, que essas células eram capazes de se diferenciar e expressar marcadores podocitários, mais especificamente na região do pólo vascular da cápsula de Bowman (Ronconi et al, 2009). Estes estudos sugerem que há um nicho de CT renal, cuja participação na

reparação se dá de maneira direta ou indireta, porém são necessários experimentos mais completos para a compreensão destes mecanismos.

Assim, os efeitos imunomoduladores prevalecem como o principal mecanismo de ação das CTm no rim. Tögel foi um dos primeiros autores a reportar que a proteção renal induzida pelas CTm em modelo de lesão renal aguda isquêmica foi mediada pela inibição de citocinas pró-inflamatórias e estímulo de citocinas anti-inflamatórias (Tögel et al, 2005).

No presente estudo, a análise da expressão relativa das interleucinas pró-inflamatórias no tecido renal corroborou os efeitos imunomoduladores induzidos pelas CTm. Aos 60 dias pós-inoculação de CTm, a expressão de IL-1 β e TNF α foi significativamente menor que a verificada no grupo não tratado. Observou-se também que a administração das CTm foi capaz de aumentar a expressão gênica de maneira significativa das interleucinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, aos 60 dias, em comparação ao grupo PAN.

Perfis similares de predomínio do perfil de resposta Th2 foram observados em outros modelos experimentais de lesão renal. No modelo de ablação renal 5/6, animais que receberam CTm apresentaram, após 8 semanas, diminuição da IL-1 β , IL-6 e TNF α , assim como aumento de IL-4 e IL-10 (Semedo et al, 2009). O mesmo padrão de resposta foi observado em camundongos submetidos à isquemia renal e sacrificados seis semanas depois de receberem a infusão de CTm (Donizetti-Oliveira et al, 2012).

As CTm são células imunoprivilegiadas devido à baixa expressão, em sua superfície, do complexo de histocompatibilidade de classe II e de moléculas

co-estimulatórias. Além disso, podem agir em diferentes vias da resposta imunitária por interação direta célula-a-célula e secreção de alguns fatores solúveis (Corcione et al, 2006), como TGF- β , HGF, prostaglandina E2, heme-oxigenase 1, HLA-G5 e VEGF entre outros (Uccelli et al, 2008; Flaquer et al, 2010). *In vitro*, as CTm inibem a proliferação de células T, B, *natural killers* (NK) e dendríticas (CD) (Aggarwal et al, 2005). As CTm também podem interferir em algumas funções das células imunes: a secreção de citocinas e a própria citotoxicidade de células T e NK; maturação das células B e secreção de anticorpos, a maturação e ativação de CD, e na apresentação de antígenos (Uccelli et al, 2008).

Neste cenário, um ambiente inflamatório é necessário para promover o efeito das CTm e estimular algumas moléculas relacionadas com inflamação. O interferon- γ , isoladamente ou em combinação com as citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1 α ou IL-1 β , estimula a produção de quimiocinas pelas CTm, culminando na ativação das células T por meio da produção de óxido nítrico e exercendo efeito imunomodulador (Ren et al, 2008). As CTm também liberam interleucinas anti-inflamatórias como a IL-10 e a IL-4. Experimento *in vitro* mostrou que esplenócitos, estimulados com aloantígenos na presença de meio onde foram cultivadas CTm, foram capazes de produzir quantidades significativas de IL-10 (Yang et al, 2009). O bloqueio dessa interleucina reverteu a inibição da proliferação de células T anteriormente constatada, reafirmando o importante papel desempenhado por essa citocina na modulação do sistema imune (Rasmusson et al, 2005).

No presente estudo, aos 60 dias, o grupo tratado apresentou significativo aumento da expressão relativa do VEGF em comparação ao grupo PAN. As taxas de expressão foram semelhantes às aquelas verificadas no grupo Controle, e são um provável efeito das CTm. Estudo em modelo de lesões mínimas demonstrou que a PAN promove *downregulation* do VEGF, mantendo baixas as taxas de expressão até 28 dias (Fan et al, 2002). Nos rins, o VEGF participa da regulação e manutenção dos podócitos através de efeitos parácrinos e autócrinos, sendo sua presença indispensável para o desenvolvimento glomerular, como comprovado em estudo utilizando camundongos *knockouts* para esse gene (Guan et al, 2006; Eremina et al, 2003).

Experimento com CTm, provenientes de camundongos *knockouts* para o VEGF, demonstrou que quando estas células foram utilizadas como tratamento em modelo de lesão renal por isquemia/reperfusão, houve menor efeito positivo sobre a função renal e os índices de mortalidade (Togöl et al, 2009). Entretanto, há somente um estudo abordando o mecanismo de ação das CTm especificamente nos podócitos. Utilizando modelo *in vivo* de lesão experimental por adriamicina, as CTm induziram maior expressão glomerular de VEGF (Zoja et al, 2012). E no modelo *in vitro*, foi demonstrado que as CTm protegeram podócitos expostos à adriamicina através de maior expressão de VEGF, assim como apresentaram também maior ativação da via da Akt. Esta via, quando ativada, está relacionada à menor apoptose e maior sobrevivência das células (Datta et al, 1999). Sendo o VEGF um dos fatores responsáveis pela ativação da via da Akt nos podócitos (Foster et al,

2005), a hipótese considerada é de que as CTm exerçam seu efeito protetor aumentando, através do VEGF, a ativação da via da Akt (Zoja et al, 2012). Nesse aspecto, estudos *in vitro* talvez sejam as melhores alternativas para detalhar, de forma ordenada, quais os reguladores de expressão envolvidos, e quais vias de indução e/ou repressão as CTm estimulam nos podócitos. No presente estudo, prevalece a hipótese que as CTm possam atuar na regulação da expressão das proteínas podocitárias, através das suas propriedades imunomoduladoras, o que é reforçado com os resultados da expressão relativa de VEGF no tecido renal, confirmando o papel protetor das CTm no modelo de podocitopatia induzido pela PAN.

A presença de CTm também influenciou positivamente a atividade proliferativa celular. Embora a hipótese de que as CTm possam ter estimulado a proliferação dos podócitos seja plausível, foi observado predomínio de células em proliferação na região tubular. Resultado semelhante foi descrito em modelo de lesão renal aguda induzida por injeção intramuscular de glicerol (Herrera et al, 2004b). Os autores demonstraram um aumento da atividade proliferativa tubular identificada por imunohistoquímica para PCNA. De qualquer maneira, a maior atividade proliferativa encontrada parece ser reflexo da ação das CTm no tecido renal.

A análise do efeito da inoculação das CTm sobre o infiltrado de células inflamatórias, mais especificamente macrófagos e linfócitos T, não encontrou variação em relação ao grupo PAN. De fato, o grupo PAN apresentou, aos 30 dias, um número de macrófagos 5 vezes maior que o controle.

Entretanto, deve ser considerado que a PAN também causa um intenso infiltrado túbulo intersticial, mobilizando uma grande quantidade de macrófagos e linfócitos, com lesões similares às encontradas na nefrite túbulo-intersticial e com valores até 6 vezes maiores quando comparado com animais que não receberam essa droga (Eddy, 1989). Esta maciça infiltração de células inflamatórias no tecido renal, como observado, parece ser dificilmente revertida. Apenas como efeito comparativo, no modelo de ablação renal 5/6, o número de macrófagos que infiltra o tecido renal é aproximadamente um terço do observado no modelo PAN (Fujihara et al, 2003)

Nos experimentos *in vitro*, glomérulos foram isolados e caracterizados por imunocitoquímica para um marcador podocitário, o WT1. Assim, foi possível realizar a cocultura com CTm e observar o comportamento destas células quando em conjunto com glomérulos. Os resultados analisados através de citometria de fluxo, por um período de até 14 dias de cultura, demonstram que a população de CTm não sofre interferência dos glomérulos em relação a expressão de seus marcadores característicos de padrão mesenquimal.

A utilização de glomérulos saudáveis pode ter contribuído para a manutenção do padrão mesenquimal das células, uma vez que trabalho recente demonstrou que células derivadas da MO cultivadas em conjunto com células epiteliais tubulares só expressaram marcadores característicos dessa população quando as células tubulares eram previamente danificadas,

demonstrando que provavelmente fatores renotrópicos possuem importante papel na regulação e diferenciação destas células (Singaravelu et al, 2009).

A cultura de CTm derivadas da MO com colágeno IV foi realizada na tentativa de estimular sua diferenciação em podócitos, conforme demonstrado anteriormente por Perry et al (2006). Entretanto, os resultados do presente estudo não sugerem esse efeito positivo. No trabalho citado, a presença de proteínas podocitárias nas células cultivadas foi determinada por imunofluorescência e seus resultados mostraram que o WT1 passou a ser expresso pelas CTm após 7 dias de cultura, mesmo se cultivadas na ausência de colágeno IV, com predomínio de marcação em região nuclear. Utilizando imunocitoquímica, foi possível observar um aumento discreto na marcação desta proteína nas CTm cultivadas na presença de colágeno IV, porém, semelhante aos resultados daqueles autores, a expressão relativa do WT1 não foi diferente entre as culturas.

A sinaptopodina foi outra proteína pesquisada no presente estudo. Os experimentos mostraram uma expressão discretamente aumentada de sinaptopodina nas CTm cultivadas com colágeno IV. Os autores supracitados mostraram que a sinaptopodina apresentou uma marcação de padrão linear nas células expostas ao estímulo, o que denotaria sua diferenciação em podócitos, visto que CTm cultivadas sem colágeno IV não expressaram essa proteína. Apesar do aumento discreto no número de células expressando sinaptopodina, não foi observado o padrão relatado. Os experimentos de expressão gênica dessa proteína também não mostraram

diferenças entre os grupos. É importante notar que no trabalho citado, não foi demonstrada uma diferenciação completa de CTm em podócitos, pois as células não expressaram podocina, resultado semelhante observado no presente estudo. Também foi avaliada a expressão de nefrina, proteína não estudada pelos pesquisadores e cujos resultados não diferiram dos já relatados. Associado a estes achados, os experimentos de análise de expressão dos marcadores de superfície, realizados através de citometria de fluxo, não demonstraram alterações no padrão das CTm cultivadas na presença de colágeno IV.

Até o momento não há relato na literatura de outras tentativas, utilizando-se CTm derivadas de MO, de reprodução dos resultados obtidos por Perry, sugerindo que as condições criadas pelos pesquisadores foram singulares e que a diferenciação de CT em podócitos dependa de outros fatores, ou até mesmo que as CTm não sejam as células ideais para este fim. Outros tipos celulares, como CTm provenientes de líquido amniótico, foram capazes de expressar o marcador podocitário CD2AP, mas falharam em relação à outras proteínas podocitárias (Siegel et al, 2009). Recentemente na Austrália foram realizados experimentos de diferenciação celular com células tronco de pluripotência induzida, originárias de células mesangiais de rim humano normal. Através de estímulo com meio de cultura composto por ativina A, BMP-7 (*bone morphogenic protein*) e ácido retinóico, após 10 dias, essas células se diferenciaram em podócitos, comprovado através de imunofluorescência para WT1, PAX2, nefrina, podocina e sinaptopodina. Também foi demonstrado pela técnica de PCR em tempo real maior

expressão de marcadores podocitários e diminuição de um marcador de pluripotencialidade, o OCT3/4 (Song et al, 2012). A criação de condições especiais, atreladas ao tipo de célula ideal e a complexidade do podócito, fazem com que a obtenção deste tipo celular seja um desafio para futuras pesquisas.

Na última década os podócitos assumiram o protagonismo na fisiopatologia glomerular, merecendo inúmeras pesquisas a fim de elucidar os mecanismos complexos que o regulam. Essa evolução é conduzida a fim de se obter possíveis terapêuticas para deficiências de uma célula altamente diferenciada. O presente estudo estimula a utilização das CTm, cuja ação imunomoduladora pode ser uma alternativa no tratamento das podocitopatias. Estudos clínicos de fase I em pacientes portadores de podocitopatias devem ser estimulados a fim de se avaliar esse possível papel protetor desempenhado pelas CTm.

8. CONCLUSÃO

A terapia celular com CTm, no modelo de nefropatia crônica por lesão de podócitos, foi capaz de induzir proteção renal caracterizada por diminuição da pressão arterial, da proteinúria e da albuminúria, associado a menor fusão dos pedicelos à microscopia eletrônica, maior expressão de proteínas podocitárias e de expressão celular de WT1. As citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10, em conjunto com o VEGF, foram os possíveis mediadores responsáveis por estes resultados.

8. ANEXOS

9.1. Anexo A

Experimentos Fase I

Foram utilizados ratos Wistar, machos, em número de cinco por grupo, pesando entre 200 a 250 gramas. Os animais foram obtidos de uma colônia mantida pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Estes animais foram alojados em gaiolas comportando até 5 ratos e mantidos à temperatura de 22 °C, num ciclo claro/escuro de 12 horas.

Neste estudo os animais do grupo controle receberam somente a injeção de solução salina 0,9%, e os animais do grupo PAN receberam a droga na dose de 150 mg/Kg, ambos via caudal (**Figura 1**). Todos os animais receberam dieta normossódica e água *ad libitum*. Os dois grupos foram acompanhados por um período de 30 dias.

Figura 1. Protocolo inicial de indução do modelo experimental com puromicina, respectiva análise dos parâmetros bioquímicos e sacrifício com 30 dias.

Resultados dos experimentos Fase I

Evolução Ponderal

Os animais do grupo PAN apresentaram menor ganho ponderal, com 10 dias, em relação ao grupo Controle (221 ± 38 g vs. 319 ± 5 g, respectivamente; $p < 0,05$). Com 30 dias de experimento a diferença permaneceu significativa entre os grupos PAN (310 ± 29 g) e Controle ($378 \pm 2,2$ g) (**Figura 2**).

Figura 2. Peso dos animais com 5, 10, 15 e 30 dias de experimento.

* $p < 0,05$ vs. grupo Controle.

Proteinúria

Durante o experimento o grupo PAN apresentou valores de proteinúria superiores aos do grupo Controle. Entretanto, a diferença significativa entre o grupo PAN e Controle foi verificada somente com 15 dias (224 ± 46 mg/24h vs. 13 ± 11 mg/24h, respectivamente; $p < 0,05$). Com 30 dias de experimento houve uma diminuição acentuada na excreção de proteínas urinárias no grupo PAN (**Figura 3**).

Figura 3. Excreção urinária de proteína durante 24 horas.

* $p < 0,05$ vs grupo Controle.

Albuminúria

Os animais do grupo PAN apresentaram valores superiores quando comparados ao Controle. Com 15 dias de experimento foi verificada diferença estatística entre os grupos PAN e Controle (920 ± 31 mg/ml vs. 5 ± 1 mg/ml, respectivamente; $p < 0,05$). Com 30 dias houve diminuição acentuada da albuminúria no grupo PAN (**Figura 4**).

Figura 4. Excreção urinária de albuminúria durante 24 horas.
* $p < 0,05$ vs grupo Controle.

Glomeruloesclerose e Fibrose Intersticial

Os animais do grupo PAN com 30 dias de indução da doença apresentaram um aumento na porcentagem de glomeruloesclerose ($1,1 \pm 0,5\%$ vs. 0 ± 0 , $p=NS$) e fibrose intersticial ($0,69 \pm 0,2\%$ vs. $0,22 \pm 0,1\%$, $p=NS$) em relação ao grupo Controle, porém sem significância estatística (**Figura 5 e 6**).

Figura 5. Gráfico com os resultados de glomeruloesclerose e fibrose intersticial dos grupos com 30 dias.

Figura 6. A) Glomeruloesclerose no animal do grupo PAN com 30 dias.
B) Fibrose intersticial no grupo PAN com 30 dias

9.2. Anexo B

Experimentos Fase II

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 220 a 250 gramas e também ratos Lewis, machos, pesando entre 220 a 280 gramas, em número de 5 por grupo, obtidos de uma colônia mantida pelo Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Estes animais foram alojados em gaiolas comportando até 5 ratos e mantidos à temperatura de 22 °C, num ciclo claro/escuro de 12 horas.

Neste protocolo os dois grupos receberam a droga PAN (150 mg/Kg), via caudal, e foram sacrificados com 10, 15 ou 30 dias (**Figura 7**). Todos os animais receberam dieta normossódica e água *ad libitum*.

Figura 7. Protocolo de indução em ratos Lewis e Wistar, respectiva análise dos parâmetros bioquímicos e sacrifício com 30 dias.

Resultados dos experimentos Fase II

Evolução Ponderal

O peso dos animais dos grupos Wistar e Lewis iniciou os experimentos com valores aproximados ($278\pm 10\text{g}$ vs. $258\pm 10\text{g}$, $p=\text{NS}$). Houve um decréscimo no ganho ponderal do grupo Wistar durante o período analisado, porém com 30 dias não houve diferença significativa em relação ao grupo Lewis ($276\pm 6\text{g}$ vs. $273\pm 13\text{g}$, $p=\text{NS}$) (**Figura 8**).

Figura 8. Peso dos animais com 5, 10, 15 e 30 dias de experimento.

Proteinúria

Durante o experimento os animais apresentaram elevados valores de proteinúria. Com 15 dias os grupos Lewis e Wistar atingiram o valor máximo de excreção urinária de proteínas, com 245 ± 43 mg/24h vs. 306 ± 50 mg/24h, respectivamente, $p=NS$. Após 30 dias os valores diminuíram, porém os animais do grupo Wistar permaneceram com valores mais elevados do que os animais do grupo Lewis (130 ± 79 mg/24h vs. 80 ± 27 mg/24h, respectivamente, $p=NS$ (**Figura 9**).

Figura 9. Excreção urinária de proteína durante 24 horas nos grupos Lewis e Wistar. * $p < 0,05$ vs. grupos 5 dias.

Albuminúria

Houve diferença estatística em relação aos valores de 5 dias e 15 dias: grupo Lewis com 158 ± 27 mg/ml vs. 420 ± 65 mg/ml e grupo Wistar com 320 ± 55 mg/ml vs. 610 ± 136 mg/ml, ambos com $p < 0,05$ (**Figura 10**).

Figura 10. Excreção urinária de albumina durante 24 horas.
* $p < 0,05$ vs. grupos 5 dias.

9.3. Anexo C

Experimentos Fase III

Foram utilizados 18 ratos (seis animais por grupo) Wistar, machos, pesando entre 230 e 350 gramas, obtidos de uma colônia mantida pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas comportando até 5 ratos, mantidos à temperatura de 22 °C, num ciclo claro/escuro de 12 horas e divididos em 3 grupos:

GRUPO G1: animais que receberam duas doses de 150mg/kg de PAN.

GRUPO G1Nx: animais que foram submetidos a nefrectomia unilateral e receberam duas doses de 150mg/kg de PAN.

GRUPO G2: animais que receberam três doses (150mg/kg cada) de PAN.

Para a administração da PAN os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Ketamina-S, Cristália) + Xilazina (70 mg/Kg). No grupo G1Nx foi realizada nefrectomia via lombotomia direita e uma dose de 150 mg/Kg de PAN foi injetada intraperitonealmente. Para a sutura da musculatura abdominal foi usado fio cromado 5-0 (Brasuture, São Sebastião da Grama, Brasil), utilizando pontos contínuos e a sutura da pele foi realizada com fio de algodão (Brasuture, São Sebastião da Grama, Brasil) 4-0.

Após 15 dias a segunda dose de PAN foi administrada para todos os grupos. Após 30 dias, apenas o grupo G2 recebeu a terceira dose da droga (**Figura**

11). Após cada injeção os animais foram novamente alojados em gaiolas com comida e água e mantidos até o fim do período experimental. Todos os animais receberam dieta normossódica e água *ad libitum*. Os sacrifícios foram realizados com 30, 45 e 60 dias.

Figura 11. Protocolo experimental com aplicação de PAN em diferentes tempos associado ou não a nefrectomia, com bioquímica e sacrifício nos dias 30, 45 e 60.

Resultados dos experimentos fase III

Evolução Ponderal

A evolução ponderal demonstrou uma discreta perda de massa corpórea nos animais do grupo G1Nx durante o período do estudo, com recuperação aos 60 dias. Podemos observar que neste grupo houve uma queda no peso dos animais no pós-operatório, com recuperação aos 45 dias. Os animais do grupo G1 foram sacrificados com 30 dias e os animais do grupo G2 não sobreviveram até o 60º dia. Não houve diferença estatística no peso entre os grupos (Figura 12).

Figura 12. Variação do peso dos animais durante o período experimental.

Pressão Arterial

A pressão arterial dos três grupos analisados apresentou elevação em relação aos valores obtidos no pré-experimento, sendo significativa ($p < 0,05$) nos grupos G1Nx e G2 com 15 dias (**Figura 13**).

Figura 13. Pressão arterial caudal dos animais ao longo do período experimental. * $p < 0,05$ vs. pré.

Proteinúria

Durante o experimento todos os grupos apresentaram proteinúria significativa ($p < 0,05$). O grupo G2 apresentou valores de proteinúria superiores aos outros grupos após a 3ª dose de PAN, porém com alta mortalidade entre os dias 30 e 45 (66,6 %) (**Figura 14**).

Figura 14. Excreção urinária de proteína em 24 horas, ao longo do período experimental. * $p < 0,05$ vs. pré; # $p < 0,05$ vs. 30 dias.

Albuminúria

Durante o experimento todos os grupos apresentaram albuminúria significativa ($p < 0,05$) (**Figura 15**).

Figura 15. Excreção urinária de albumina em 24 horas, ao longo do período experimental. * $p < 0,05$ vs. pré.

Glomeruloesclerose

A figura 12 representa os resultados obtidos quanto ao grau de glomeruloesclerose dos grupos. Os animais do grupo G1Nx com 45 e 60 dias apresentaram maior esclerose em relação aos demais grupos, embora não significativa (**Figura 16**).

Fig. A

Fig. B

Figura 16. **A)** Índice de glomeruloesclerose dos animais com até 60 dias de experimento. **B)** Fotos dos animais em G1 30 dias, G1Nx 45 dias e G2 45 dias, respectivamente.

Fibrose Intersticial

Os resultados da fibrose intersticial estão apresentados na figura 13. Com 45 e 60 dias houve mais fibrose intersticial no grupo G1Nx, porém não significativa (**Figuras 17**).

Fig. A

Fig. B

Figura 17. A) Índice de fibrose intersticial nos grupos experimentais até 60 dias. **B)** Fotos dos animais em G1 30 dias, G1Nx 45 dias e G2 45 dias, respectivamente.

10. REFERÊNCIAS

1. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005; 15;105(4):1815-22.
2. Akhtar M, Al Mana H. Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol*. 2004; 11:304-9.
3. Alexandre CS, Volpini RA, Shimizu MH, Sanches TR, Semedo P, di Jura VL, Câmara NO, Seguro AC, Andrade L. Lineage-negative bone marrow cells protect against chronic renal failure. *Stem Cells* 2009; 27:682-92.
4. Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamsom J, Wright NA. Hepatocytes from nonhepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406:257.
5. Anderson S, Diamond JR, Karnovsky MJ, Brenner BM. Mechanisms underlying transition from acute glomerular injury to late glomerular sclerosis in a rat model of nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1988; 82:1757-68.
6. Banfi G, Moriggi M, Sabadini E, Fellin G, D'Amico G, Ponticelli C. The impact of prolonged immunosuppression on the outcome of idiopathic focal-segmental glomerulosclerosis with nephrotic syndrome in adults. A collaborative retrospective study. *Clin Nephrol* 1991; 36:53-9.
7. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. A proposed taxonomy for the podocytopathies: a reassessment of the primary nephrotic diseases. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007; 2:529-42.
8. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999; 283:534-7.
9. Brazelton TR, Rossi MVR, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290:1775-9.
10. 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; 40:853-5.

11. Caldas HC, Hayashi AP, Abbud-Filho M. Repairing the chronic damaged kidney: the role of regenerative medicine. *Transplant Proc.* 2011; 43:3573-6. Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2011; 8;4:20.
12. Cattran DC, Appel GB, Hebert LA, Hunsicker LG, Pohl MA, Hoy WE, Maxwell DR, Kunis CL. A randomized trial of cyclosporine in patients with steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. North America Nephrotic Syndrome Study Group. *Kidney Int* 1999; 56:2220-6.
13. 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. *Transplant Proc* 2009; 41:947-51.
14. 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 Aug 2. [Epub ahead of print].
15. Chun MJ, Korbet SM, Schwartz MM, Lewis EJ. Focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic adults: presentation, prognosis, and response to therapy of the histologic variants. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(8):2169-77.
16. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Riso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006;107(1):367-72.
17. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.* 1999;13(22):2905-27.
18. de Zoysa JR, Topham PS. Podocyte biology in human disease. *Nephrology (Carlton).* 2005;10:362-7.
19. Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky MJ. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1986; 29:478-83.
20. Diamond JR, Karnovsky MJ. Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of puromycin aminonucleoside. *Am J Pathol* 1986; 122:481-7.
21. Donizetti-Oliveira C, Semedo P, Burgos-Silva M, Cenedeze MA, Malheiros DM, Reis MA, Pacheco-Silva A, Câmara NO. Adipose tissue-derived stem cell treatment prevents renal disease progression. *Cell Transplant.* 2012;21(8):1727-41.

22. Doyonnas R, Kershaw DB, Duhme C, Merkens H, Chelliah S, Graf T, McNagny KM. Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. *J Exp Med*. 2001; 194:13-27.
23. Dunér F, Lindström K, Hulténby K, Hulkko J, Patrakka J, Tryggvason K, Haraldsson B, Wernerson A, Pettersson E. Permeability, ultrastructural changes, and distribution of novel proteins in the glomerular barrier in early puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephron Exp Nephrol*. 2010; 116:e42-52.
24. Durik M, Sevá Pessôa B, Roks AJ. The renin-angiotensin system, bone marrow and progenitor cells. *Clin Sci (Lond)*. 2012;123(4):205-23.
25. Eddy AA. Interstitial nephritis induced by protein-overload proteinuria. *Am J Pathol*. 1989;135(4):719-33.
26. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest*. 2003; 111:707-16.
27. Fan L, Wakayama T, Yokoyama S, Amano O, Iseki S. Downregulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in the kidney in rats with puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephron*. 2002;90(1):95-102.
28. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, Chang JM, Choi HY, Campbell KN, Kim K, Reiser J, Mundel P. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med*. 2008; 14:931-8.
29. Fishman JA, Karnovsky MJ. Effect of aminonucleoside of puromycin on glomerular epithelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1985; 118:398-407.
30. Flaquer M, Romagnani P, Cruzado JM. Growth factors and renal regeneration. *Nefrologia*. 2010;30(4):385-93.
31. Foster RR, Saleem MA, Mathieson PW, Bates DO, Harper SJ. Vascular endothelial growth factor and nephrin interact and reduce apoptosis in human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(1):F48-57.
32. Fujihara CK, Noronha IL, Malheiros DM, Antunes GR, de Oliveira IB, Zatz R. Combined mycophenolate mofetil and losartan therapy arrests established injury in the remnant kidney. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:283-90.

33. Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, Andreoli N, Malheiros DM, Noronha IL, Zatz R. Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition limits abnormal COX-2 expression and progressive injury in the remnant kidney. *Kidney Int.* 2003;64(6):2172-81.
34. Furness PN, Hall LL, Shaw JA, Pringle JH. Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14:1234-7.
35. Glasser RJ, Velosa JA, Michael AF. Experimental model of focal sclerosis. Relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1977; 36:519-26.
36. Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol.* 2012; 74:299-323.
37. Guan F, Villegas G, Teichman J, Mundel P, Tufro A. Autocrine VEGF-A system in podocytes regulates podocin and its interaction with CD2AP. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 291:422-8.
38. 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; 30:211-26.
39. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 1996; 84:345-57.
40. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kren S, Eidman K, Connaire J, Heremans Y, Lund T, Blackstad M, Jiang Y, Luttun A, Rosenberg ME. Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(11):3028-40.
41. Gurkan UA, Akkus O. The mechanical environment of bone marrow: a review. *Ann Biomed Eng* 2008; 36:1978-91.
42. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401:390-4.
43. Hara A, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Kawachi H, Shimizu F, Shibuya M, Matsushima K, Yokoyama H, Egashira K, Kaneko S. Blockade of VEGF accelerates proteinuria, via decrease in nephrin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2006; 69:1986-95.
44. Hauser PV, Pippin JW, Kaiser C, Krofft RD, Brinkkoetter PT, Hudkins KL, Kerjaschki D, Reiser J, Alpers CE, Shankland SJ. Novel siRNA delivery system to target podocytes in vivo. *PLoS One* 2010; 5:e9463.

45. Herman-Edelstein M, Thomas MC, Thallas-Bonke V, Saleem M, Cooper ME, Kantharidis P. Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor- β : a model for diabetic podocytopathy. *Diabetes*. 2011; 60:1779-88.
46. Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 2006a; 24:2840-50.
47. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med* 2004b;14:1035-41.
48. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med* 2004b;14:1035-41.
49. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, Stamenkovic I, Biancone L, Camussi G. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney Int*. 2007;72(4):430-41.
50. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102:3483-93.
51. Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, Gans RO, Janssen WM, Grobbee DE, de Jong PE; Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study Group. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation*. 2002;106(14):1777-82.
52. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer* 2007; 96:1020-4.
53. Hou FF, Xie D, Zhang X, Chen PY, Zhang WR, Liang M, Guo ZJ, Jiang JP. Renoprotection of Optimal Antiproteinuric Doses (ROAD) Study: a randomized controlled study of benazepril and losartan in chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(6):1889-98.
54. Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells*. 2007;25(9):2363-70.
55. Ikarashi K, Li B, Suwa M, Kawamura K, Morioka T, Yao J, Khan F, Uchiyama M, Oite T. Bone marrow cells contribute to regeneration of damaged glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 2005; 67:1925-33.

56. Imasawa T, Nagasawa R, Utsunomiya Y, Kawamura T, Zhong Y, Makita N, Muso E, Miyawaki S, Maruyama N, Hosoya T, Sakai O, Ohno T. Bone marrow transplantation attenuates murine IgA nephropathy: role of a stem cell disorder. *Kidney Int* 1999; 56:1809-17.
57. Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2625–2635.
58. Jarad G, Pippin JW, Shankland SJ, Kreidberg JA, Miner JH. Dystroglycan does not contribute significantly to kidney development or function, in health or after injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 300:811-20.
59. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418:41-9.
60. Kasinath BS, Singh AK, Kanwar YS, Lewis EJ. Effect of puromycin aminonucleoside on HSPG core protein content of glomerular epithelial cells. *Am J Physiol* 1988; 255:590-6.
61. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 108:1583-7.
62. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein - nephrin - is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*. 1998; 1:575-82.
63. Kim YH, Goyal M, Kurnit D, Wharram B, Wiggins J, Holzman L, Kershaw D, Wiggins R. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int* 2000; 60:957-68.
64. Kramer H, Jacobs DR Jr, Bild D, Post W, Saad MF, Detrano R, Tracy R, Cooper R, Liu K. Urine albumin excretion and subclinical cardiovascular disease. The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Hypertension*. 2005;46(1):38-43.
65. Kreidberg JA, Symons JM. Integrins in kidney development, function, and disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000; 279:233-42.

66. Kinomura M, Kitamura S, Tanabe K, Ichinose K, Hirokoshi K, Takazawa Y, Kitayama H, Nasu T, Sugiyama H, Yamasaki Y, Sugaya T, Maeshima Y, Makino H. Amelioration of cisplatin-induced acute renal injury by renal progenitor-like cells derived from the adult rat kidney. *Cell Transplant*. 2008;17:143-58.
67. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Muller-Newen G, Yu D, Floege J. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:2202-12.
68. 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; 68:1613-17.
69. Lebleu V, Sugimoto H, Mundel TM, Gerami-Naini B, Finan E, Miller CA, Gattone VH 2nd, Lu L, Shield CF 3rd, Folkman J, Kalluri R. Stem cell therapies benefit Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:2359-70.
70. Li B, Morioka T, Uchiyama M, Oite T. Bone marrow cell infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat model. *Kidney Int* 2006; 69:323-30.
71. Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Shaw AS, Miner JH. CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000; 279:785-92.
72. Li PK, Leung CB, Chow KM, Cheng YL, Fung SK, Mak SK, Tang AW, Wong TY, Yung CY, Yung JC, Yu AW, Szeto CC, HKVIN Study group. Hong Kong study using valsartan in IgA nephropathy (HKVIN): a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Kidney Dis* 2006; 47:751-60.
73. Lin F, Moran A, Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest*. 2005;115(7):1756-64.
74. Magnasco A, Corselli M, Bertelli R, Ibatci A, Peresi M, Gaggero G, Cappiello V, Chiavarina B, Mattioli G, Gusmano R, Ravetti JL, Frassoni F, Ghiggeri GM. Mesenchymal stem cells protective effect in adriamycin model of nephropathy. *Cell Transplant*. 2008;17:1157-67.
75. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103:697-705.

76. Marshall CB, Pippin JW, Krofft RD, Shankland SJ. Puromycin aminonucleoside induces oxidant-dependent DNA damage in podocytes in vitro and in vivo. *Kidney Int* 2006; 70:1962-73.
77. Mathieson PW. Update on the podocyte. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; 18:206-11.
78. Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem*. 2005;95(4):827-39.
79. Meirelles LDA S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br. J. Haematol* 2003; 123:702-11.
80. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cell. *Exp. Biol. Med* 2001; 226:507-20.
81. Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, Rottoli D, Angioletti S, 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; 15:1794-804.
82. Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol (Berl)* 1995; 192:385-97.
83. Mundel P, Reiser J, Zúñiga Mejía Borja A, Pavenstädt H, Davidson GR, Kriz W, Zeller R. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res*. 1997;236:248-58.
84. Nakhoul F, Ramadan R, Khankin E, Yaccob A, Kositch Z, Lewin M, Assady S, Abassi Z. Glomerular abundance of nephrin and podocin in experimental nephrotic syndrome: different effects of antiproteinuric therapies. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289:880-90.
85. Nielsen JS, McNagny KM. The role of podocalyxin in health and disease. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20:1669-76.
86. Ninichuk V, Gross O, Segerer S, Hoffmann R, Radomska E, Buchstaller A, Huss R, Akis N, Schlondorff D, Anders HJ. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3 deficient mice. *Kidney Int* 2006; 70:121-9.
87. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19:193-204.

88. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83:253-307.
89. Perry J, Tam S, Zheng K, Sado Y, Dobson H, Jefferson B, Jacobs R, Thorner PS. Type IV collagen induces podocytic features in bone marrow stromal stem cells in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:66-76.
90. Pierchala BA, Muñoz MR, Tsui CC. Proteomic analysis of the slit diaphragm complex: CLIC5 is a protein critical for podocyte morphology and function. *Kidney Int* 2010; 78:868-82.
91. Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC, Durvasula RV, Hauser PV, Kowalewska J, Krofft RD, Logar CM, Marshall CB, Ohse T, Shankland SJ. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296:213-29.
92. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.
93. Poulosom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarajah 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; 195:229-35.
94. Praga M, Hernández E, Montoyo C, Andrés A, Ruilope LM, Rodicio JL. Long-term beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with nephrotic proteinuria. *Am J Kidney Dis* 1992; 20:240-8.
95. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulosom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *J Clin Pathol* 2003; 56: 86-96.
96. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):141-50.
97. Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res*. 2005; 305(1):33-41.
98. Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Antioxidants protect podocyte foot processes in puromycin aminonucleoside treated rats. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4:1974-86.
99. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cell. *Cell Prolif* 2004; 37:23-34.

100. Rippon HJ, Lane S, Qin M, Ismail NS, Wilson MR, Takata M, Bishop AE. Embryonic stem cells as a source of pulmonary epithelium in vitro and in vivo. *Proc. Am. Thorac. Soc* 2008; 5:717-22.
101. Roberts SG. Transcriptional regulation by WT1 in development. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15:542-7.
102. Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML, Lazzeri E, Mazzinghi B, Ballerini L, Parente E, Becherucci F, Gacci M, Carini M, Maggi E, Serio M, Vannelli GB, Lasagni L, Romagnani S, Romagnani P. Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:322-32.
103. Rookmaaker MB, Smits AM, Tolboom H, Van'tWout K, Martens AC, Goldschmeding R, Joles JA, Van Zonneveld AJ, Grone HJ, Rabelink TJ, Verhaar MC. Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2003; 163:553-62.
104. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attié T, Gubler MC, Antignac C. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol.* 2002; 160:131-9.
105. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:7962-7.
106. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(9):2443-56.
107. 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):661-73.
108. Smedo P, Correa-Costa M, Cenedeze MA, Malheiros DM, Antonia dos Reis M, Shimizu MH, Seguro AC, Pacheco-Silva A, Saraiva Camara NO. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant Kidney Model. *Stem Cells* 2009; 27:3063-73.

109. 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; 39:421-3.
110. Sesso Rde C, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Watanabe Y, Santos DR. Chronic dialysis in Brazil - report of the brazilian dialysis census, 2011. *J Bras Nefrol*. 2012; 34(3):272-7.
111. Shah SV. Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int* 1989; 35:1093-106.
112. Shiiki H, Sasaki Y, Nishino T, Kimura T, Kurioka H, Fujimoto S, Dohi K. Cell proliferation and apoptosis of the glomerular epithelial cells in rats with puromycin aminonucleoside nephrosis. *Pathobiology* 1998; 66:221-29.
113. Siegel N, Valli A, Fuchs C, Rosner M, Hengstschläger M. Induction of mesenchymal/epithelial marker expression in human amniotic fluid stem cells. *Reprod Biomed Online*. 2009; 19(6):838-46.
114. Singaravelu K, Padanilam BJ. In vitro differentiation of MSC into cells with a renal tubular epithelial-like phenotype. *Ren Fail*. 2009; 31(6):492-502.
115. Someya T, Kaneko K, Yamada T, Yamashiro Y. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone, on puromycin aminonucleoside induced nephrosis in rats. *Pediatr Nephrol* 2005; 20:1430-4.
116. Song B, Smink AM, Jones CV, Callaghan JM, Firth SD, Bernard CA, Laslett AL, Kerr PG, Ricardo SD. The Directed Differentiation of Human iPS Cells into Kidney Podocytes. *Plos One*. 2012; 7 (9):e46453.
117. Taal MW, Brenner BM. Renal risk scores: progress and prospects. *Kidney Int* 2008; 73:1216-9.
118. 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; 289:31-42.
119. 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):475-85.
120. Tögel FE, Westenfelder C. Mesenchymal stem cells: a new therapeutic tool for AKI. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6:179-83.

121. Tögel FE, Westenfelder C. Kidney protection and regeneration following acute injury: progress through stem cell therapy. *Am J Kidney Dis.* 2012; 60(6):1012-22.
122. Tryggvason K, Wartiovaara J. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001; 10:543-9.
123. Tryggvason K, Pettersson E. Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. *J Intern Med* 2003; 254:216-24.
124. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med.* 2006; 354:1387-401
125. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):726-36.
126. Uchimura H, Marumo T, Takase O, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T, Hishikawa K, Fujita T. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:997-1004.
127. Upadhyay A, Hwang SJ, Mitchell GF, Vasan RS, Vita JA, Stantchev PI, Meigs JB, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Fox CS. Arterial stiffness in mild-to-moderate CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(9):2044-53.
128. van Koppen A, Joles JA, van Balkom BW, Lim SK, de Kleijn D, Giles RH, Verhaar MC. Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease. *PLoS One.* 2012;7(6):e38746.
129. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends. Cell. Biol* 2002; 12:502-8.
130. Wada T, Pippin JW, Marshall CB, Griffin SV, Shankland SJ. Dexamethasone prevents podocyte apoptosis induced by puromycin aminonucleoside: role of p53 and Bcl-2-related family proteins. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2615-25.
131. Wharram BL, Goyal M, Gillespie PJ, Wiggins JE, Kershaw DB, Holzman LB, Dysko RC, Saunders TL, Samuelson LC, Wiggins RC. Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptp^{pro})-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J Clin Invest.* 2000; 106:1281-90.

132. Wiggins RC, Wiggins JE, Goyal M, Wharram BL, Thomas PE. Molecular cloning of cDNAs encoding human GLEPP1, a membrane protein tyrosine phosphatase: characterization of the GLEPP1 protein distribution in human kidney and assignment of the GLEPP1 gene to human chromosome 12p12-p13. *Genomics*. 1995; 27:174-81.
133. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61:364-70.
134. Xia L, Zhou M, Kalhorn TF, Ho HT, Wang J. Podocyte-specific expression of organic cation transporter PMAT: implication in puromycin aminonucleoside nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296:1307-13.
135. Yang HD, Dong C, Guan FJ, Gao LL, Zhao T, Feng BF. Bone mesenchymal stem cell transplantation repairs glomerular podocytes in rats with puromycin aminonucleoside-induced nephrosis. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2010;12(6):483-7.
136. Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, Nam HY, Kim YH, Kim B, Park CG. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med*. 2009; 41(5):315-24.
137. Yarmolinsky MB, De la Haba GL. Inhibition by puromycin of amino acid incorporation into protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1959; 45:1721-9.
138. Yuan H, Takeuchi E, Salant DJ. Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002; 282:585-91.
139. 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):1370-81.