JOSÉ MANUEL CÓNDOR CAPCHA

Avaliação de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano em lesão de órgãos e disfunção endotelial na sepse

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia da Conceição Andrade

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cóndor Capcha, José Manuel

Avaliação de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano em
lesão de órgãos e disfunção endotelial na sepse / José Manuel Cóndor Capcha. --
São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Lúcia da Conceição Andrade.

Descritores: 1.Sepse 2.Transplante de células-tronco mesenquimais 3.Cordão
umbilical 4.Geléia de Wharton 5.Terapia celular 6.Ratos Wistar.

USP/FM/DBD-169/15

DEDICATORIA

À minha mãe Luisa, pelo amor e dedicação incondicional em todos os momentos da minha vida, pelo exemplo de vida e por me fazer, a cada dia, uma pessoa melhor.

À minha família, pelo carinho e apoio em distintas fases de minha vida.

À minha orientadora Lúcia, pela confiança, exemplo, apoio e pelos ânimos em cada momento.

Aos meus amigos e mestres, pelas lições de vida.

AGRADECIMENTOS

Essa dissertação de mestrado é o resultado da dedicação e da contribuição de muitos esforços pois nada seria possível sem a colaboração de grandes pessoas. Com entusiasmo e muitos sentimentos encontrados agradeço:

À minha orientadora, médica, pesquisadora e mulher exemplar, **Dra. Lúcia da Conceição Andrade**, pela oportunidade, confiança e incentivo na execução desse trabalho. Agradeço de coração não somente por ser uma excelente orientadora, mas também por ser como uma mãe nesta fase de minha vida, pelos conselhos, apoio, carinho e pelas oportunidades a frente. Minha grande admiração e eterna gratidão para sua pessoa.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Seguro**, que me recebeu desde o primeiro dia que fui ao laboratório, muito obrigado pelos conselhos e pela calorosa acolhida no LIM 12. Lembrarei sempre as conversas sobre Mario Vargas Llosa e o famoso orientador Antonino Santos Rocha.

À **Dra. Camila Eleuterio Rodrigues**, pela ajuda, sugestões e sempre com a disponibilidade para trabalhar nesse mundo experimental das células-tronco, sepse e rim. Fico verdadeiramente grato, aprendi muitas coisas com você.

À **Dra. Maria Heloissa Massola Shimizu**, pelo entusiasmo e momentos divertidos que passamos na bancada, além dos conselhos e sua forma especial de enxergar a vida. Admiro você como mulher, mãe, biomédica e pesquisadora.

À **Dra. Daniele Canale**, pelo apoio nos experimentos do tratamento experimental, por estar sempre aí resolvendo dificuldades, agradeço por ser essa pessoal especial que mantém a boa convivência dentro do laboratório.

Ao **Dr. Rildo Aparecido Volpini**, pelos ensinamentos em matéria de histologia e imunohistoquímica, além das sugestões e apoio no desenvolvimento do presente trabalho.

Ao **Prof. Ms. Roberto Moreira Souza**, pelas sugestões e ensinamentos não somente na parte acadêmica, mas também no acontecer da vida diária. Vou lembrar sempre desse grande parceiro corinthiano.

À **Ms. Nathalia Moreira Santos e família**, com menção especial, pelo apoio e carinho desde o início quando cheguei ao Brasil e durante minha estadia, minha irmãzinha e a família que me adotou, vou agradecer sempre esse gesto de amor. Vocês marcaram esta parte de minha vida.

Aos colegas do LIM 12, **Dra. Carol Bragança, Dra. Talita Sanches, Leticia Urbano, Ms. Daniela Ferreira, Dra. Fernanda Coelho, Ms. Monique Martinez, Dr. Pedro Gois, Dr. Weberton Luchi, Dr. Marcelo Augusto, Igor Oliveira**, pelas sugestões e boa convivência no laboratório.

Aos funcionários do LIM 12, **Nivaldo, Eloá e Denisse**, pelo apoio administrativo, sugestões, dicas e muitas coisas mais. Sempre vou agradecer aqueles bons momentos compartilhados.

À **Profa. Dra. Irene de Lourdes Noronha**, pelo suporte na cultura celular dentro do laboratório LIM 29

À **Dra. Samira Gomes**, pelas recomendações e por ser sempre tão atenciosa.

Aos meus amigos do LIM 29, **Priscila, Cleonide, Talita, Margot, Rita Caligleri, William felix, Rafael Pepinelli, Felipe Silva**, pelas sugestões e principalmente pelo carinho e atenção em cada momento. Graças a vocês o LIM 29 ficou um lugar tão agradável.

À **Profa. Dra. Maria Irigoyen**, pelo suporte nos experimentos hemodinâmicos e vasculares dentro do laboratório de hipertensão.

Aos meus amigos do Laboratório de hipertensão, **Leandro, Fernando e Diego**, pela ajuda e sugestões na bancada experimental.

Ao **Prof. Dr. Niels Saraiva Camara**, pelo suporte na parte de citometria e pelas sugestões no desenvolvimento deste e outros trabalhos.

Ao **Dr. Danilo Candido e Juan Henao**, pela atenção, amizade e colaboração nos experimentos com citometria.

À **Profa. Dra. Elnara Negri, Nelsa e Marcelo**, pelo suporte e recomendações na leitura de lâminas.

Ao **Prof. Dr. Antonio José Barros Magaldi** e **Profa. Dra. Cláudia Helou Maria**, pelas sugestões e recomendações não só em matéria experimental, mas também no acontecer diário.

Às minhas amigas do Laboratório de Imunohistoquímica, **Angela e Cristina**, não só pelo apoio nos experimentos, mas também pelas atenções e carinho.

Aos meus amigos da FMUSP, **Carolina Romão, Rafael, Solange, André Luiz, Alexandre, Adalberto, Natalia Maduréia e Larissa**, pela amizade e atenção em diversos momentos.

Aos meus amigos peruanos no Brasil, **Juissan Ariza, Diana Torres e William Roldan**, pela ajuda e companhia.

À minha querida **UNMSM**, minha alma *mater*, com quem sempre fico em dívida, graças a ela me formei em tecnologia médica, aprendi muitas lições, moldei os meus pensamentos e minha forma de enxergar a vida, San Marcos você é e será sempre um de meus motivos para ir para frente, quem somos parte você, verdadeiramente ficamos com esse sentimento e missão.

Àos meus mestres e amigos do Perú, **Rocio Cordova, Willy Cerón, José Antonio Paredes, Marco Alvarez, José Luis Aguilar e Iván Lozada**, pelo apoio, confiança, oportunidades e principalmente por me inserir nesse mundo maravilhoso das células-tronco mesenquimais.

Aos meus amigos brasileiros de muitos e gratos momentos compartilhados, **Humberto Moraes, Carina Takahama, Neyton, Victor Monteiro e Kai Hsu**. Fico muito agradecido, lembrarei sempre a vocês.

À FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo), pelo suporte e financiamento do presente trabalho.

E a todos aqueles que por ventura não foram mencionados aqui, mais que contribuíram para este sonho, muitíssimo obrigado.

EPIGRAFE

三种方法，我们可以学到的智慧：首先，通过反射，这是最高尚的;其次，通过模仿，这是最简单的;第三靠经验，这是最痛苦的。

(Tradução livre)

Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo.

Confúcio

Esta dissertação ou 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. Divisão 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. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Sepses.....	02
1.2. Fisiopatologia da sepsis.....	06
1.3. Biomarcadores.....	10
1.4. Modelos experimentais da sepsis.....	11
1.5. Terapias na sepsis.....	12
1.6. Células-tronco e Células-tronco Mesenquimais.....	13
1.7. Células-tronco Mesenquimais na sepsis.....	18
 2. OBJETIVOS.....	 19
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
 3. MÉTODOS.....	 21
3.1. Considerações gerais.....	22
3.2. Desenho experimental.....	24
3.3. Indução de sepsis.....	25
3.4. Obtenção, cultivo e expansão das CTM de cordão umbilical humano	26
3.5. Caracterização das células-tronco mesenquimais	28
3.5.1. Imunofenotipagem	28
3.5.2. Ensaios de diferenciações	28
3.6. Medições Renais e metabólicas.....	30
3.6.1. <i>Clearance</i> de inulina (Taxa de filtração glomerular).	30
3.6.2. Função tubular.....	31
3.7. Função Hepática.....	33
3.8. Sacrifício dos animais.....	33
3.9. Estudo da expressão de proteínas (Western Blotting)	33
3.10. Estudo Histológico	34
3.10.1. Estudo de imuno-histoquímica e área intersticial em tecido renal.....	35

3.10.2. Estudo histoquímico do fígado.....	36
3.10.3. Estudo TUNEL do rim.....	36
3.11. Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Obtenção das células-tronco mesenquimais e análise de sobrevivência.	39
4.1.1. Caracterização das células-tronco mesenquimais	39
4.1.2. Análise da sobrevivência.	43
4.2. Avaliação renal	44
4.2.1. Taxa de filtração glomerular.....	44
4.2.2. Função tubular renal.....	46
4.2.3. Níveis plasmáticos de eletrólitos.....	49
4.2.4. Histologia renal.....	51
4.3. Avaliação Hepática.....	53
4.3.1. Avaliação dos níveis séricos das enzimas hepáticas.....	53
4.3.1. Histologia hepática.....	55
4.4. Avaliação molecular renal - endotelial.....	57
4.4.1. Expressão de marcadores anti-inflamatórios e protetores do endotélio renal.....	57
4.4.2. Expressão de marcadores mediadores da inflamação.....	59
4.4.3. Expressão de marcadores reguladores de apoptose.....	61
4.4.3. TUNEL.....	63
4.4.3. Expressão de AQP2.....	65
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÃO.....	75
7. REFERÊNCIAS.....	77
8. ANEXOS.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
ATB	Antibiótico
Bpm	Batimentos por minuto
BT	Bilirrubina Total
C5a	Complemento componente 5a
CDs	Células dendríticas
CH ₂ O	Clearence de água livre
CID	Coagulação intravascular disseminada
CLP	do inglês, <i>Cecal ligation puncture</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
Cr	Creatinina
CT	Células-tronco
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
CTM	Células-tronco Mesenquimais
CTR	Células-tronco adultas residentes
dL	Decilitros
DMOS	Disfunção de múltiplos órgãos.
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	do inglês, <i>US Food and Drug Administration</i>
FE	Fração de excreção
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
FR	Frequência respiratória
FSC	Fator de células-tronco
FT	Fator tissular
G	Gravitacional
GW	Geleia de Wharton
H ₂ O	Água
HIF	Fator de indução de hipóxia
HLA-DR	do inglês, <i>Human leukocyte antigen - DR</i>
HMGB1	do inglês, <i>High Mobility Group Box Protein Type 1</i>

IC	Intervalo de confiança
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina 10
INR	<i>International normalized ratio</i>
iPS	Células pluripotentes induzidas
IR	Injúria respiratória
IRA	Injúria renal aguda
K	Potássio
Kg	Quilogramas
LPC	Ligadura e punção do ceco
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Fenótipo do macrófago pro-inflamatório
M2	Fenótipo anti-inflamatório
mEq	Miliequivalentes
mg	Miligramas
MIF	Fator inibidor de macrófagos
mm ²	Milímetros quadrados
mmHg	Milímetros de mercúrio
MSC	do inglês, <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
°C	Graus centígrados
P	Fósforo
P1	Passagem 1
PaCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono.
PAI- 1	do inglês, <i>Plasminogen-activator inhibitor type- 1</i>
PAM	Pressão arterial média
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PAS/D	Pressão arterial sistólica/diastólica
PBS	Solução buffer fosfato
PCO ₂	Pressão parcial de monóxido de carbono no sangue arterial
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão

SARA	Síndrome da angústia respiratória do adulto
SF 0,9%	Soro fisiológico 0,9%
SHAM	Animal ou grupo controle
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SNA	Sistema nervoso autônomo
SRAC	Síndrome de resposta anti-inflamatória compensatória
SVO2	Saturação venosa de oxigênio
TA	Tecido adiposo
TCD4+	Células T ou linfócitos T CD4+
TGF	Taxa de filtração glomerular
TGF- β 1	Fator de crescimento transformante β 1
Th1	Fenótipo pró-inflamatório das células T CD4+
Th2	Fenótipo anti-inflamatório das células T CD4+
TLCE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Tempo de atividade da protrombina
Tregs	Células T reguladoras
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
U	Uréia
UI	Unidades internacionais
UTI	Unidade de Terapia Intensiva.
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental desde a submissão ao comitê de ética e coleta do material biológico até as avaliações funcionais.....	23
Figura 2 - Desenho da avaliação dos animais.	25
Figura 3 - Processamento do cordão umbilical.	27
Figura 4 - <i>Clearance</i> de inulina.	31
Figura 5 - Células-tronco mesenquimais em cultura.	40
Figura 6 - Imunofenotipagem das células-tronco (Passagem 3, P3).....	41
Figura 7 - Diferenciação das células-tronco.	42
Figura 8 - Curva de sobrevivência.	43
Figura 9 - Taxa de filtração glomerular (TFG), avaliada 24 horas após a indução da sepse, aferida pelo <i>clearance</i> de inulina.	45
Figura 10 - Função tubular renal, avaliada 24 horas após a indução da sepse, aferida pela fração de excreção (FE) de eletrólitos.....	47
Figura 11 - Função tubular, avaliada após 24 horas da indução da sepse, aferida pela osmolalidade, Débito urinário e <i>clearance</i> de água livre	48
Figura 12 - Eletrólitos plasmáticos, avaliados após 24 horas da indução da sepse	50
Figura 13 - Área intersticial relativa renal e número de células CD68 positivas/0,087mm ² do compartimento túbulo-intersticial do tecido renal, avaliada 24 horas após a indução da sepse.....	51

Figura 14 -Histologia renal e imunolocalização de células CD68+/0,087mm ² , avaliada 24 horas após a indução da sepse	52
Figura 15 -Níveis séricos da atividade das enzimas hepáticas, avaliados após 24 horas da indução da sepse.....	54
Figura 16 -Avaliação dos depósitos de glicogênio hepático.....	55
Figura 17 -Histologia hepática, avaliada 24 horas após a indução de sepse.....	56
Figura 18 -Marcadores anti-inflamatórios e protetores do endotélio renal, avaliados 24 horas após a indução da sepse.....	58
Figura 19 -Marcadores mediadores da inflamação, após 24 horas de indução da sepse.....	60
Figura 20 -Marcadores reguladores de apoptose, após 24 horas de indução da sepse.....	62
Figura 21 -Células TUNEL positivas/0,087mm ² do compartimento túbulo-intersticial do tecido renal, avaliadas 24 horas após a indução da sepse.....	63
Figura 22 -Reação TUNEL para avaliação de apoptose, avaliada 24 horas após a indução de sepse.....	64
Figura 23 -Expressão de Aquaporina 2.....	65
Figura 24 -Ação das CTM derivadas de geleia de Warton de cordão umbilical humano em modelo experimental de sepse (ligadura e punção do ceco).....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definições para a compreensão da sepse	04
Tabela 2 - Critérios diagnósticos de sepse	05
Tabela 3 - Avaliação da taxa de filtração glomerular	44
Tabela 4 - Avaliação da função tubular renal	46
Tabela 5 - Avaliação de eletrólitos plasmáticos	49
Tabela 6 - Níveis séricos das enzimas hepáticas.....	53
Tabela 7 - Marcadores anti-inflamatórios e protetores do endotélio renal.....	57
Tabela 8 - Marcadores mediadores da inflamação	59
Tabela 9 - Marcadores reguladores de apoptose.....	61
Tabela 10 - Expressão de Aquaporina 2.....	65

RESUMO

Cóndor Capcha JM. *Avaliação de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano em lesão de órgãos e disfunção endotelial na sepse [Dissertação].* São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A sepse é uma doença relacionada como a presença de infecção junto a uma resposta inflamatória sistêmica; sua fisiopatologia envolve uma rede complexa de citocinas e mediadores inflamatórios que causam a injúria de diversos tecidos. Na atualidade são muitas as tentativas para diminuir a mortalidade, porém até agora, não existe uma estratégia específica para tratar a doença. As células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton do cordão umbilical (CTM-GW) são conhecidas por expressar genes e fatores envolvidos na angiogênese e imunomodulação. Nós usamos o modelo de ligadura e punção do ceco (LPC) para analisar o papel da CTM-GW em disfunção orgânica relacionada à sepse. Foi utilizada a citometria de fluxo para avaliar o fenótipo das células isoladas. Dividimos ratos Wistar em grupos: sham (operação simulada); LPC; e LPC + CTM (10^6 CTM-GW i.p., 6 horas após LPC). Às 24 h pós-LPC, foram avaliadas a função renal, hepática e outras variáveis do estudo. As CTM-GW foram negativas para CD3, CD34, CD45 e HLA-DR, enquanto eles foram positivos para CD73, CD90 e CD105. O tratamento com CTM na sepse reduziu a mortalidade, melhorou a filtração glomerular (aferido pelo *clearance* de inulina), função tubular, reduziu a lesão hepática e demonstrou uma ação anti-inflamatória. O tratamento também apresentou um efeito anti-apoptótico e protetor do tecido renal e do endotélio, mediante a regulação da expressão de VEGF, AQP2 e eNOS. Em conclusão as CTM-GW diminuem a injúria renal e hepática, portanto, pode desempenhar um papel protetor na sepse.

Descritores: *Sepse; transplante de células-tronco mesenquimais; cordão umbilical; geleia de Wharton, terapia celular; ratos Wistar.*

ABSTRACT

Condor Capcha JM. *Evaluation of human umbilical cord mesenchymal stem cells in organ damage and endothelial dysfunction in sepsis [Dissertation]*. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Sepsis is a disease related to the presence of infection with a systemic inflammatory response. The pathophysiology involves complex cytokine and inflammatory mediator networks that cause injury to various tissues. Currently, there are many attempts to reduce mortality, but so far, there is no specific strategy for treating the disease. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells (hWJ-MSCs) are known to express genes and factors involved in angiogenesis and immunomodulation. We used a cecal ligation and puncture (CLP) model to analyze the role of hWJ-MSCs in sepsis-related organ dysfunction. We used flow cytometry to evaluate hWJ-MSC phenotypes. We divided Wistar rats into groups: sham (sham-operated); CLP; and CLP+MSC (10^6 WJ-MSCs, i.p., 6 h after CLP). At 24 h post-CLP, we evaluated renal function, liver and other variables. hWJ-MSCs were negative for CD3, CD34, CD45 and HLA-DR, whereas they were positive for CD73, CD90 and CD105. In sepsis, treatment with MSC reduced mortality, improved glomerular filtration rate (measured by inulin *clearance*), tubular function, reduced liver damage and decreased the inflammatory markers. The treatment also showed an anti-apoptotic effect and protected the renal tissue and endothelium by up-regulation the expression of VEGF, AQP2 and eNOS. In conclusion, hWJ-MSCs decrease renal and hepatic injury, therefore, may play a protective role in sepsis.

Descriptors: *Sepsis; mesenchymal stem cells transplantation; umbilical cord; Wharton jelly; cell therapy; rats, Wistar.*

1. Introdução

1.1. Sepses

Na antiga Grécia as manifestações clínicas da sepsis já eram conhecidas, sendo Hipócrates (460-377 a.C.), quem a denominou com termo “σῆψις” o que significa putrefação ou decomposição de material orgânico.¹ No entanto, não foi até o século XX, que Hugo Schottmüller (1867-1936) publicou as bases para a definição moderna da sepsis e foi o primeiro a descrever que a presença de uma infecção é um componente fundamental da doença. Anos depois, Lewis Thomas (1913-1993), mudou a compreensão da patologia, criando a teoria que “a sepsis está mais relacionada à resposta do hospedeiro ao microrganismo do que relacionada às características do microrganismo”.² Finalmente, em 1989, Roger C. Bone (1941-1997), descreveu a sepsis como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que pode ocorrer durante infecção, conceito este que entrou na prática clínica e que é válido até hoje.^{3,4}

Na atualidade a síndrome sepsis é definida como a provável ou documentada presença de infecção junto a uma resposta inflamatória sistêmica. Ela representa uma doença deletéria que é evidenciada primeiramente pela SIRS, que pode progredir à sepsis severa e logo ao choque séptico.⁵ Embora os sintomas sejam muito complexos e inespecíficos, seu diagnóstico se tornou mais parametrizado após o consenso da Conferência internacional de definição de sepsis em 2001 (Tabela 1 e 2).⁶

A nível mundial, a sepsis é a principal causa de morte, com 8 a 13% de incremento anual.⁷ No Brasil, segundo um estudo epidemiológico desenvolvido em 5 unidades de terapia intensiva (UTI) nos estados de São Paulo e Santa Catarina, foi identificado uma incidência de 57,9 por 1000 pacientes-dia (95% IC 51,5 – 65,3) e uma taxa de mortalidade de sepsis, sepsis severa e choque séptico de 33,9%; 46,9% e 52,2%, respectivamente.⁸

Outros estudos como COSTS I e Sepsis Brasil apresentaram resultados com taxas quase similares,^{9,10} neste último se evidenciou que a taxa de mortalidade no

choque séptico é uma das mais elevadas no mundo, além da gravidade dos pacientes e maior tempo de internação. Também se identificou que as principais fontes de infecção nas UTIs do Brasil, foram o trato respiratório (69%) e o abdômen (23,1%), sendo os bacilos gram-negativos os mais prevalentes (40,1%), seguido de cocos gram-positivos (32,8%) e as infecções fúngicas (5%). O estudo COSTS I demonstrou também que a sepse gera um custo médio de 9632.00 dólares americanos por paciente (95% IC 8657 – 10672).^{9,10}

Tabela 1. Definições para a compreensão da sepse

Termo	Definição conceitual
Síndrome de resposta Inflamatória sistêmica (SIRS)	<p>Caracterizada por ser uma resposta inespecífica do organismo a uma variedade de situações que geram inflamação – infecção.</p> <p>Para sua detecção, são necessárias duas das seguintes condições:</p> <p>Temperatura > 38,0 °C ou < 36,0 °C</p> <p>Frequência cardíaca > 90 bpm</p> <p>Frequência respiratória > 20 irpm ou PaCO₂ < 32 mmHg</p> <p>Leucócitos > 12.000/mm³ ou < 4.000/mm³ ou > 10% de bastões</p>
Sepse	SIRS desencadeada por infecção bacteriana, viral, fúngica ou parasitária
Sepse Severa	Presença de sepse acompanhada de um ou mais sinais e/ou sintomas de hipoperfusão tecidual ou disfunção orgânica como: áreas de pele moteada, tempo de enchimento capilar maior que 3 segundos, oligúria (débito urinário <0,5ml/Kg/hora por pelo menos 2 horas; lactato arterial >2mmol/L; coagulação intravascular disseminada (CID), lesão pulmonar agudo ou SARA; disfunção cardíaca entre outros.
Choque séptico	Presença de sepse severa mais uma das seguintes condições: PaS < 60 mmHg (ou < 80 se o paciente tem histórico previo de hipertensão) após infusão de 40 a 60 ml/Kg de cristalóides ou 20 a 30 ml/Kg de colóides ou necessidade de drogas vasopactivas (dopamina > 5ug/Kg/min ou noradrenalina < 0,25 5ug/Kg/min) para manter PAM > 60 mmHg (ou > 80 mmHg se tem histórico de hipertensão)
Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS)	Alterações da função de órgãos de um paciente grave, de modo que a homeostase não pode ser mantida sem intervenção terapêutica; primária se é consequente da própria injúria e Secundária, se é oriunda, não da injúria, mas da resposta orgânica do hospedeiro à condição mórbida.

Fonte: Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003;31(4):1250-1256.⁶ **PAM:** pressão arterial média, **PaCO₂:** Pressão parcial de dióxido de carbono.

Tabela 2. Critérios diagnósticos de sepse

Evidencia de infecção suspeita ou documentada de um dos seguintes:	
Variáveis	Características
Gerais	Febre: Temperatura > 38,3 °C
	Hipotermia: Temperatura < 36,0 °C
	Frequência cardíaca: > 90 bpm
	Frequência respiratória: taquipneia (>20 ipm ou PCO ₂ < 32 mmHg)
	Alteração do estado mental
	Edema significativo ou balanço hídrico positivo (> 20 ml/kg/24 horas)
	Hiperglicemia: glicemia > 120mg/dl (na ausência de diabetes mellitus)
Inflamatórias	Leucocitose: > 12.000 células/mm ³
	Leucopenia: < 4.000 células/mm ³
	Número de leucócitos: normal, porém com mais de 10% de formas imaturas
	Proteína C reativa plasmática: > 2 (Desvio padrão) acima do valor normal
	Procalcitonina plasmática: > 2 (Desvio padrão) acima do valor normal
Hemodinâmicas	Hipotensão: < 90mmHg, PAM < 70mmHg ou redução da PaS > 40mmHg em adolescentes.
	Saturação de oxigênio venoso: > 70%*
	Índice cardíaco: > 3,5 litros/min*
Disfunção orgânica	Gasometria arterial: hipoxemia (PaO ₂ / FiO ₂ < 300)
	Oligúria aguda: diurese < 0,5ml/kg/h
	Creatinina sérica > 0,5mg/dl
	Alterações da coagulação: INR > 1,5 ou TTPA > 60s ou plaquetopenia: < 100.000/mm ³
	Íleo paralítico (ausência de ruídos hidroaéreos)
Perfusão tecidual	Hiperbilirrubinemia: BT > 4mg/dl
	Hiperlactatemia: > 2,5mmol/l
	Perfusão tissular periférica reduzida

Fonte: Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003;31(4):1250-1256.⁶ **BT:** bilirrubina total; **bpm:** batimentos por minuto; FiO₂: fração inspirada de oxigênio; **INR:** *international normalized ratio*; **PAM:** pressão arterial média; **PaO₂:** pressão parcial de oxigênio no sangue arterial; **PAS:** pressão arterial sistólica; **TTPA:** tempo de tromboplastina parcial activada. *: Não valido para crianças

1.2. Fisiopatologia da sepse

Na sepse, muitas alterações imunopatológicas estão envolvidas para explicar a patogênese, porém os mecanismos subjacentes ainda são debatidos.¹⁰ A resposta do estado hiperinflamatório envolve o sistema imunológico inato e adaptativo na tentativa de eliminar os agentes patogênicos causadores da doença,¹¹ entretanto este processo também produz coletivamente a hipotensão sistêmica, os distúrbio de coagulação, a disfunção intravascular e hemodinâmica, a isquemia de órgãos-alvo e a disfunção de múltiplos órgãos.¹²

Em modelos experimentais de sepse em animais, nos estágios iniciais da doença, se apresenta frequentemente uma fase hiperdinâmica caracterizada por um aumento do débito cardíaco, taquicardia, febre, neutrofilia etc; e uma progressão para uma fase hipodinâmica caracterizada por diminuição do débito cardíaco, bradicardia, hipotensão, hipotermia, leucopenia, etc. Estas características podem ocorrer em seres humanos com sepse, mas as intervenções como a antibioticoterapia e reanimação com líquidos fazem que a sequência dos eventos fique menos evidente do que aquela encontrada em modelos experimentais.¹³ O desenvolvimento da disfunção de múltiplos órgãos (DMOS) é acompanhada com disfunção cardíaca, renal, hepática, neuronal e pulmonar, além de envolver também a vasculatura periférica. A patogênese da disfunção orgânica é multifatorial, razão pela qual até hoje é incompreendida.¹⁴ Embora sejam descritos alguns mecanismos que envolvem deposição generalizada de fibrina causando oclusão microvascular, é também o desenvolvimento de um tecido submetido a stress que compromete ainda mais a falta de oxigenação, além de outras alterações da homeostase microvascular, progredindo, portanto à hipoperfusão e hipóxia tecidual, que são fatores dominantes na sepse.¹⁵

Nessa disfunção de múltiplos órgãos, o pulmão e os rins são provavelmente uns dos órgãos mais afetados desenvolvendo insuficiência respiratória aguda (IR) e

injúria renal aguda (IRA). Fazem parte da etiologia da IRA; a inflamação, os mecanismos de coagulação intravascular, as citocinas pró-inflamatórias (que podem ser produzidos por células mesangiais renais e células endoteliais), as espécies reativas de oxigênio (que também são geradas dentro do rim, contribuindo para a fase de vasoconstrição renal e a lesão oxidativa), a disfunção epitelial e endotelial, apoptose e necrose que embora sejam encontrados em modelos de isquemia/reperfusão renal aguda com necrose tubular, o significado na sepse é menos estabelecido.^{16,17} Em um estudo com animais sépticos, se demonstrou que a necrose tubular aguda é pouco frequente na sepse, além que as alterações histopatológicas durante a doença são mínimas.¹⁸ Por outro lado, a ativação da via de coagulação com posterior deposição de fibrina também desempenha um papel na indução da lesão renal.¹⁹

Nessa alteração o fígado também se encontra comprometido. Um estudo evidenciou que existe uma incidência de icterícia de 0,6% a 54% em adultos com sepse. Reportou-se que os pacientes com injúria hepática apresentam alterações nos níveis das enzimas hepáticas e hiperbilirrubinemia em caso de disfunção orgânica. A presença de icterícia na sepse está associada principalmente à colestase.²⁰

Na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na sepse, as células do sistema imunológico são as primeiras a agir; elas apresentam os PRRs (receptores de reconhecimento padrão), são os que permitem iniciar uma resposta de defesa após um dano ao tecido ou após uma infecção microbiana, sendo esta última detectada pelos PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) que geralmente estão expressos por agentes microbianos.²¹ Após a exposição desses antígenos, a família de receptores TLR (do inglês, *Toll-like receptor*), que são uma subfamília de PPRs, induzem uma cascata de ativação celular; sendo o TLR4 e TLR2 receptores comumente envolvidos na reação séptica frente a exposição de

lipopolissacarídeos (LPS) de microrganismos gram negativos, e peptidoglicanos (PGS) dos gram positivos, respetivamente.²² Após a ligação entre PAMPs e TLRs diversos mecanismos são acionados, um deles é a ativação das quinases I κ K α e I κ K β , as quais formam o dímero I κ K, que por sua vez inibe o I κ B, que é o inibidor da transcrição do NF- κ B (Fator nuclear kappa B); que é o responsável pela ativação de genes que sintetizam mediadores pró-inflamatórios.²³

Um desses mediadores são as citocinas, que são liberadas para ativar as células como resposta à infeção, assim o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e a Interleucina 1 (IL1), que foram alvos terapêuticos para o tratamento da sepse, mas sem sucesso.²⁴ Outras citocinas como o MIF (Fator inibidor de macrófagos) e o HMGB1 (do inglês, *High Mobility Group Box Protein Type 1*) são uns dos principais mediadores pró-inflamatórios da sepse em fase aguda. O MIF é induzido fortemente por TNF- α , INF- γ (Interferon gamma) e C5a, para promover a resposta imune inata e adaptativa mediante ativação dos macrófagos e células T; e o HMGB1, que apresenta um efeito pleiotrópico sobre as células do sistema imune, promove inflamação e rompimento das barreiras epiteliais; sua ativação está mediada pela ativação do NF- κ B, e interage com vários receptores, incluindo TLR2 e TLR4.^{25,26}

Outros agentes envolvidos são o óxido nítrico (NO) e as espécies reativas de oxigênio (ERO). O NO está envolvido no relaxamento do músculo liso, e o aumento da sua produção na sepse contribui para a hipotensão, além desempenha um papel importante como mediador intracelular promovendo ativação das vias pró-inflamatórias, sendo as enzimas óxido nítrico sintases (NOS) importantes para a regulação da biossíntese do NO, a eNOS (NOS isoforma endotelial), é uma molécula importante na integridade do endotélio,²⁷ diferentes estudos experimentais demonstraram que há uma diminuição na expressão dessa enzima durante a sepse.^{28,29} As ERO são mediadoras de estresse oxidativo, que em presença de NO podem formar o peroxinitrito (potente oxidante com efeitos tóxicos em diversas

moléculas) que na sepse severa está envolvido com a apoptose celular e com a disfunção orgânica.³⁰

A ativação endotelial desempenha um papel importante na imunidade celular em resposta à sepse. O endotélio controla o tráfego de leucócitos e regula o tônus vasomotor. Na sepse a função endotelial é principalmente manter a regulação da permeabilidade.³¹ A função vascular está alterada causando a hipotensão, que surge a partir de uma combinação de hipovolemia secundária à perda de fluidos para o interstício e da vasodilatação causada pela hiporreatividade do tônus vascular. Os fatores implicados neste processo incluem: o excesso de produção de NO, a ativação de canais de potássio, e as alterações nos níveis hormonais de cortisol e vasopressina.³² Se é verdade que o débito cardíaco é normalmente elevado em pacientes com sepse após a adequada ressuscitação volêmica, é verdade também que a função miocárdica pode estar diminuída, alterando a oferta de oxigênio aos tecidos. A microcirculação pode estar comprometida tanto antes como depois da aparente adequada reposição volêmica.³³

Em um período mais tardio, se o paciente sobrevive à sepse, o ambiente pró-inflamatório altera o estado funcional das células do sistema imune, causando a disfunção de neutrófilos e imunoparalisia.³⁴ Dados recentes demonstram que um subconjunto de linfócitos liberam grandes quantidades de citocinas imunossupressoras, como a interleucina-10 (IL-10), reduzindo a expressão de HLA-DR em células apresentadoras de antígenos, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas e isto prejudica a apresentação ideal dos antígenos microbianos para as células T. Não obstante, a sepse provoca uma perda acentuada de células TCD4+ e TCD8+, assim como células B. Células T reguladoras (Tregs) são as mais resistentes à apoptose induzida pela sepse; portanto, há um aumento da porcentagem de células Tregs na circulação contribuindo para a formação de um fenótipo mais

imunossupressor.^{34,35} Células TCD4+ sobreviventes mudam o fenótipo pro-inflamatório de Th1 para um fenótipo anti-inflamatório Th2 possibilitando a anergia da resposta imune, causando assim um estado de imunossupressão conhecido também como Síndrome de resposta anti-inflamatória compensatória (SRAC). Os níveis aumentados de apoptose em linfócitos e células dendríticas (CDs), contribuem também para a supressão da resposta imune durante a sepse, colocando o paciente em riscos para adquirir infecções intra-hospitalares.³⁶ O TGF- β 1 (Fator de crescimento transformante β 1) é fator anti-inflamatório que promove a mobilização das células T reguladoras, que por sua vez, levam à retroalimentação para produzir mais TGF- β 1. Esse processo envolve a inativação das células pró-inflamatórias e induz a mudança de fenótipo do macrófago pró-inflamatório (M1) para o fenótipo anti-inflamatório (M2) e a maior secreção de IL-10, que resulta na regulação dos mediadores inflamatórios e na indução de fatores de crescimento que promove a regeneração e reparação dos tecidos.³⁷ No entanto o TGF- β 1 pode explicar em parte a polarização da resposta imune no período tardio da sepse.

Na fase aguda da sepse, com um estado hiper-inflamatório, muitas moléculas de estresse oxidativo são mobilizadas levando a ativação dos mecanismos de apoptose.^{12,52} Este fenômeno em uma fase mais tardia é responsável pela disfunção orgânica e pela imunossupressão e esse evento está caracterizado por aumento de BAX (agente pró-apoptótico) e diminuição de Bcl-xL (agente anti-apoptótico), que são os agentes envolvidos nos mecanismos da regulação da apoptose.³⁶

1.3. Biomarcadores

O VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), cumpre um papel importante nos mecanismos de reparação e sinalização para o endotélio. Este fator é induzido durante a hipóxia, estimula as células endoteliais e é importante para a

sobrevida dessas células, por outro lado também é quimiotática para os monócitos e inibem a maturação das células dendríticas. No dano endotelial causado pela sepse, o VEGF é liberado para paliar os efeitos da hipóxia, embora sabe-se que o aumento da expressão do receptor do VEGF está associado com a gravidade e sobrevida do paciente séptico. Ainda os níveis de VEGF com tal e sua associação na sepse, é um ponto de controvérsia.^{38,39}

Sabe-se que a proteína klotho se expressa fortemente em tecido renal, além que esta proteína está diminuída após insulto de IRA isquêmica e em doença renal crônica.⁴⁰ Nosso grupo demonstrou que, na sepse, há redução da expressão da proteína klotho em tecido renal (dados ainda não publicados). Por tanto, esta proteína pode ser reconhecida provavelmente como biomarcador precoce de lesão renal aguda e como provável fator nefroprotetor.⁴¹ O klotho secretado, que é o domínio extracelular da proteína transmembrana, age como um fator humoral na regulação do estresse oxidativo e provavelmente na modulação inflamatória.^{42,43}

1.4. Modelos experimentais da sepse

Existem muitos estudos em modelos animais tentando mimetizar a patologia como acontece no ser humano. A sepse como uma síndrome representa uma doença complexa, já que envolve muitos mecanismos e graus de severidade, como descrito anteriormente. No momento são conhecidos três modelos, o modelo da endotoxemia (com administração intravenosa de LPS), o modelo de ligadura e punção do ceco (LPC), que é quase considerado o modelo padrão; e finalmente, a peritonite com *stent* no cólon ascendente. Esses dois últimos têm em comum a exposição do abdômen aos fatores polimicrobianos (comumente fezes).⁴⁴ Os três modelos podem ter taxas de mortalidade semelhantes, entretanto, os picos de citocinas e o curso fisiopatológico podem variar em cada modelo. O LPC é o modelo mais relevante clinicamente.⁴⁵ Um

fato importante a considerar no modelo LPC é que a severidade da doença pode variar dependendo do comprimento do ceco ligado e do número de punções. Por exemplo, em camundongos, geralmente a ligação é realizada entre 3 a 15 mm a partir do ceco distal, quando ocorre a mais de 10 mm, observou-se uma maior taxa de mortalidade.⁴⁶

1.5. Terapias na sepse

Na atualidade existem muitos estudos e estratégias terapêuticas tentando diminuir os efeitos da sepse e melhorar a condição do paciente. São muitas as tentativas para remediar a doença, mas até hoje, não existe um agente terapêutico eficaz e eficiente. A estratégia de se utilizar os imunoterapêuticos está sendo muito considerada, mas também existem tentativas direcionadas a paliar os efeitos secundários como:

1. Melhora da integridade da barreira endotelial (Slit2n),⁴⁷
2. Diminuição do vazamento vascular (angiopoietina-1),⁴⁸
3. Bloqueio dos receptores de reconhecimento PPR (TLR4 e RAGE),^{49,50}
4. Bloqueio de mediadores pró-inflamatórios (MIF, HMGB1 e IL-17A),^{51,52,53}
5. Bloqueio das vias de apoptose,⁵²
6. Modulação das vias de coagulação (Proteína C reativa, ativação de PAR1 e PAR2),^{54,55,56}
7. Neutralização das vias do sistema do complemento (bloqueio dual de C5aR e C5L2, e neutralização de C5a),⁵⁶
8. Modulação do sistema nervoso autônomo (ramo parassimpático: estímulo do receptor $\alpha 7$ -nicotina acetilcolina em células do sistema imunológico e estimulação do vago; ramo simpático: modulação farmacológica dos receptores α - e β -adrenérgicos nos leucócitos).^{57,58}

Outra estratégia para o tratamento da sepse, é a terapia com células-tronco mesenquimais (CTM). Na atualidade as CTM estão sendo muito utilizadas; já existem ensaios clínicos destinados a uma grande variedade de patologias, assim como doenças inflamatórias, autoimunes, cardíacas, neurodegenerativas, diabetes e câncer.⁵⁹ No mercado farmacêutico existem produtos contendo CTM, que estão em ensaios clínicos fase III, esperando ser aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*, USA); esses produtos são destinados para o tratamento de patologias específicas, como a doença de Crohn e a doença do enxerto versus hospedeiro. Não obstante, continuam os estudos para avaliar a eficácia e/ou segurança das CTM em outras doenças específicas, como por exemplo a sepse. Um dos primeiros estudos que utilizaram CTM em um modelo de endotoxemia em ratos, foi realizada por Xu e colegas, em 2007.⁶⁰ Os autores demonstraram que as CTM reduziram significativamente o perfil de citocinas pró-inflamatórias no início e durante a sepse, além de levar também a uma diminuição na lesão pulmonar. Outros estudos mais recentes também demonstram que a terapia com CTM, pode ser benéfica durante a fase inicial da sepse.⁶¹ Sendo assim, faz-se necessário mais estudos experimentais para esclarecer os exatos mecanismos de ação dessas células e a segurança no seu uso.

1.6. Células-tronco e Células-tronco Mesenquimais

As células-tronco (CT) por definição são células indiferenciadas com propriedade de auto-renovação e plasticidade, sendo capazes de gerar células funcionais de diferentes tecidos.⁶² Estas características são a base da medicina regenerativa e da terapia celular, que têm por objetivo a reparação e tratamento de diversos tecidos danificados. As células-tronco são classificadas quanto a sua diferenciação e ao seu desenvolvimento: células totipotentes, pluripotentes,

multipotentes e progenitoras. As totipotentes, podem originar todos os tecidos, incluindo os anexos embrionários e extra-embrionários; essa propriedade é atribuída ao zigoto. As células pluripotentes, diferentemente das células totipotentes, não têm a capacidade de desenvolver os anexos embrionários, mas podem originar todas as células de um organismo adulto; exemplo destas células são as células-tronco embrionárias (CTE) e as células pluripotentes induzidas (iPS). As células multipotentes originam linhagens ou folheto embrionário, como exemplo, as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM). As células participam da homeostase tecidual, gerando novas células em resposta ao repovoamento celular fisiológico ou a uma injúria. Finalmente as células progenitoras, sendo encontradas em quase todos os tecidos do organismo adulto como células-tronco residentes, possuem alta capacidade replicativa; mas só podem originar um tipo de tecido.⁶³

As CTM são consideradas células multipotentes não hematopoiéticas com propriedade de auto-renovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e não mesenquimais.⁶⁴ Para situações de transplante, estas células são mais acessíveis, porque não apresentam rejeição além de serem mais fáceis para sua obtenção. O primeiro relato das CTM foi realizado na década de 70, pelo pesquisador russo Friedenstein e seus colaboradores, que as descreveu como células aderentes, morfológicamente semelhantes a fibroblastos e com alta capacidade de adesão à superfície plástica.⁶⁵ Foram mudando muitos nomes e descrições, até que no ano 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) sugeriu três critérios para defini-las: primeiro estas células devem ser aderentes em cultura; segundo, devem expressar os antígenos CD73, CD90 e CD105 em ausência de antígenos hematopoiéticos tais como CD34, CD45, marcadores de monócitos, macrófagos e linfócitos B; e terceiro, as CTM devem ser capazes de diferenciar-se *in*

vitro em osteoblastos, adipócitos e condrócitos sob condições padronizadas de cultivo.^{66,67}

As CTM possuem diversas propriedades, como por exemplo o *homing*. Em muitos experimentos demonstrou-se que a administração intravenosa e intraperitoneal das CTM foi eficaz pois estas conseguiram migrar para os tecidos lesados, como coração, pulmão, cérebro, fígado, e rim. Esta característica é devido à sua capacidade intrínseca para migrar ao longo de gradientes quimiotáticos nos tecidos lesados.⁶⁸⁻⁷² Outro estudo demonstrou que durante uma endotoxemia induzida por LPS, as CTM infundidas via endovenosa, apresentaram uma maior afinidade para o pulmão e fígado,⁷³ enquanto outro estudo demonstrou que após uma sepse polimicrobiana, as CTM estão em maior concentração no pulmão, rim, e baço.⁷⁴ O *homing* das CTM compartilha muitas semelhanças com os leucócitos, como a expressão específica de selectinas e integrinas, e por conseguinte a transmigração para os tecidos lesados.^{75,76} Por outro lado, também existem fatores estimulantes que propiciam a migração como o G-CSF (fator de estimulação de granulócitos) e a hipoxia,⁷⁷ além do MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos), MCP-3, fator de células-tronco (FSC), , IL-6, e IL-8. Sendo o SDF-1 (fator de células do estroma derivada), CXCL12, CXCR-4, HIF (fator de indução de hipóxia), CCR1, CCR2, CCR4, CXCR5, CCR7, CCR9, CCR10 CCR8, CXCR1, CXCR2 e CXCR3, que são os principais receptores envolvidos nesse processo.⁷⁸⁻⁸⁰ O VEGF além de ser uma molécula anti-inflamatória, também protege o endotélio e favorece a revascularização. Wang M, et. al., demonstraram que o VEGF é um fator de proteção no tratamento com células tronco.^{39.}

As CTM desempenham também um papel na sinalização parácrina. Estudos demonstraram que essas células promovem a regeneração de tecidos lesados, além de melhorar a função geral de tecidos após insultos, tais como isquemia ou infecção bacteriana.⁸¹ No entanto, em doenças que evoluem rapidamente como a sepse, a interação das CTM com células e tecidos adjacentes podem assumir maior

importância na imunomodulação da doença e na sobrevivência do hospedeiro; sendo que elas poderão melhorar esse potencial através de uma redução da inflamação local e sistêmica, além da redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias.⁸² Segundo os estudos de modulação se evidenciaram que os principais fatores de ação são: o TGF- β 1 (fator de crescimento transformante), IL-10, IL-13, e proteína 6 (TSG-6), que formam parte do perfil de citocinas anti-inflamatórias das CTM.⁸³

Efeitos anti-apoptóticos também são envolvidos como uma das propriedades. Vários estudos em infarto/reperfusão miocárdica demonstraram que as CTM são capazes de promover a sobrevivência das células da margem de área de infarto do miocárdio. Se evidenciaram também que as células possuem mecanismos anti-apoptóticos como a regulação e reparo do DNA, regulação das vias de morte mitocondrial, aumento da atividade antioxidante e alteração da expressão de proteínas pró-apoptóticas.^{84,85} Estudos demonstraram o efeito do dimorfismo sexual entre macho e fêmea frente a administração das CTM, sendo que as CTM têm maior efetividade em fêmeas, durante um modelo de endotoxemia.⁸⁶

A ativação de células-tronco residentes também foi evidenciada após a administração de CTM. Existe uma gama de fatores de crescimento secretados pelas células que tem o potencial neoangiogênico, além destas também estarem envolvidas na mobilização de populações de células-tronco adultas residentes (CTR).⁸⁷ Zisa et al. revelaram que o VEGF é um fator parácrino secretado pelas CTM para mediar a injúria ao coração.⁸⁸ A hipóxia de órgãos-alvo (distúrbio encontrado na isquemia/reperfusão), é um fator para mobilizar CTR. Contudo maiores estudos serão necessários para se avaliar a participação das CTM na mobilização e proliferação das CTR na sepse.⁸⁹

As CTM apresentam efeitos imunomoduladores. Trabalhos na literatura demonstraram que elas são capazes de suprimir a resposta imune modulando a proliferação das células T, B e NK, e inibindo a diferenciação, maturação e ativação

de células dendríticas.⁹⁰ Por outro lado, como essas células não expressam antígenos de superfície (carência de moléculas de classe II do MHC) não iniciam uma resposta imune no transplante alogênico e até xenogênico.^{91,92} Fatores secretados como TGF- β 1, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), prostanglandina E2 (PGE2), IL-10, indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), fator inibidor de leucemia (LIF), entre outros, são atribuídos como responsáveis pela ação imunomoduladora das CTM; e moléculas como ICAM-1 e VCAM-1 são importantes para a interação das CTM com os linfócitos, mediando assim a capacidade imunomoduladora. Além disso, elas são capazes de induzir a proliferação das células T reguladoras, o que também contribui para a imunomodulação dos fenótipos Th1 e Th17, para Th2.⁹³⁻⁹⁵

Para sua obtenção, as CTM são regularmente isoladas de tecido de origem mesodérmica e não mesodérmica. Inicialmente, elas eram isoladas da medula óssea (MO), especificamente do estroma, onde cumpriam funções de suporte e reparo de células estromais. O uso de CTM de MO foi tornando-se pouco frequente na prática pois o acesso à MO é mais difícil e há também pouca produção de CTM. Outra fonte para obtenção das CTM é o tecido adiposo (TA), sendo uma ótima fonte. Outro modo de obtenção das CTM é do cordão umbilical; podendo ser retirado do sangue ou do estroma (geleia de Wharton) do cordão.⁹⁶ Uma importante diferença entre as CTM derivadas do TA ou do cordão umbilical é que estas últimas são mais jovens, apresentando um maior comprimento de telômeros, o que lhe permite proliferar por mais tempo sem ter danos citogenéticos.^{97,98}

As CTM derivadas da Geléia de Wharton do Cordão Umbilical podem ser encontradas, além do estroma, em torno dos vasos umbilicais. Pesquisas demonstraram que essas células possuem características similares às CTM derivadas de outros tecidos, quanto a morfologia, a plasticidade, o fenótipo e a produção de citocinas, porém elas podem ter maior número de passagens até alcançar a senescência.⁹⁹ As CTM representam uma boa alternativa para o tratamento e terapia

de diversas doenças. Estudos demonstraram que as CTM expressam alfa-actina de músculo liso, desmina e vimentina,¹⁰⁰ o que é útil para a engenharia tecidual. Além disso, também se demonstrou, em modelos de infarto do miocárdio em ratos, que elas expressam fatores transcripcionais de pluripotência, Oct-4, Nanog e Sox2 apresentando capacidade de angiogênese e diminuição da apoptose.^{100,101}

1.7. Células-tronco Mesenquimais na sepse

As CTM apresentam muitas propriedades que podem paliar o efeito sistêmico da sepse. Nos primeiros estudos, já foi demonstrado que as células permitem melhora da sobrevida e diminuição de citocinas pró-inflamatórias, induzem produção de citocinas anti-inflamatórias, reduzem migração dos neutrófilos, reduzem apoptose, melhoram o clearance bacteriano, aumentam a atividade fagocítica dos macrófagos e atenuam a disfunção orgânica. Entretanto outros estudos não conseguiram demonstrar estes achados. Mei et al, administraram CTM de tecido adiposo e não encontraram diferenças significativas na sobrevida.¹⁰² Chang Ch et al, administrou CTM de tecido adiposo e não encontrou diferenças significativas, em relação ao efeito inflamatório da doença, tanto no grupo séptico (modelo de ligadura e punção do ceco) quanto ao grupo tratado com CTM.¹⁰³ Muitas questões precisam ainda serem respondidas como quando administrar a terapia celular após a indução da sepse, a quantidade de células, a via de administração e a fonte ou tipo de células.¹⁰³

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal é avaliar o efeito das células tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical humano na injúria renal, hepática e disfunção endotelial induzida, em um modelo de sepse animal (modelo de ligadura e punção do ceco em ratos).

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar as células-tronco mesenquimais do cordão umbilical;
- Avaliar a sobrevida nos grupos experimentais;
- Avaliar a função renal, tubular, hepática e endotelial nos grupos experimentais;

3. Métodos

3.1. Considerações gerais

Para realização deste estudo foram usadas Células-tronco mesenquimais (CTM) de cordão umbilical humano obtido de puérperas voluntárias após orientação quanto aos propósitos do protocolo e assinatura de consentimento informado. O procedimento de coleta de amostras foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP (**Registro CEP-HU/USP: 1278/13**) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**Nº de parecer: 378.603 – PLATBR CAAE: 18323513.2.0000.0065**). Termo de consentimento livre e esclarecido (TLCE), conforme normas estabelecidas pelos referidos comitês e pela resolução 196/96 do Conselho nacional de Saúde (CNS 196/96).

Para a realização experimental de indução da sepse, foram usados Ratos Wistar machos com pesos entre 200 – 280 gramas, próximo de 8 semanas de vida; foram obtidos do Biotério Central da FMUSP e tiveram livre acesso à água e a dieta padrão para ratos. Nós utilizamos o modelo de LPC (Ligadura e Punção do Ceco) descrito por *Holly MK et al.*¹⁰⁴ O estudo foi aprovado paralelamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O plano de trabalho se desenhou em função dos aspectos éticos da obtenção do cordão umbilical e o uso dos animais de experimentação, a partir desses direcionamentos jerarquizamos os procedimentos e avaliações experimentais. (**Figura 1)**

Figura 1 - Desenho experimental desde a submissão ao comitê de ética e coleta do material biológico até as avaliações funcionais. SHAM: grupo controle com cirurgia abdominal, LPC+CTM: LPC mais tratamento com 10^6 células-tronco mesenquimais, via intraperitoneal.

3.2. Desenho experimental

Curva de sobrevida:

- Primeiro conjunto de experimentos:

Foram feitos 3 grupos de animais: Grupos: SHAM, LPC e LPC+CTM para a curva de sobrevida. Os animais foram avaliados 6 horas após o procedimento cirúrgico e a cada 12 horas até 120 horas, ao término do tempo, todos os animais que continuavam vivos foram sacrificados com dose excessiva de anestésico; $n = 9$ animais por cada grupo.

Avaliação Renal, Hepática e Endotelial:

- Segundo conjunto de experimentos:

Outro conjunto de três grupos foram submetidos a sepse/sham. Após 24 horas da indução, os animais foram sedados e foi feita a cirurgia para o *clearance* de inulina. Após o término do *clearance*, foram colhidos sangue e urina (processados e guardados no -70C para posterior análise); os rins foram perfundidos e retirados (para imunohistoquímica e Western blotting); $n = 7$ animais por cada grupo. **(Figura 2)**

Figura 2 - Desenho da avaliação dos animais. SHAM: grupo controle, LPC: grupo induzido à sepse, LPC + CTM: grupo induzido à sepse com tratamento de 10^6 CTM após 6h da injúria.

3.3. Indução de Sepse

No grupo controle, sob anestesia com tribromoetanol 2,5% (2,2,2 tribromoetanol, 99%), dose 250mg/Kg, os animais foram submetidos a laparotomia abdominal com incisão longitudinal mediana de cerca de 3,5 cm e o ceco foi localizado e exposto. No grupo LPC (Ligadura e punção do ceco), após localização, foi realizada a perfuração e ligadura do ceco com fio nylon 3.0 cerca de 1,5 cm abaixo da válvula íleo-cecal. O ceco então foi puncionado duas vezes com jelco 14 e pressionado levemente para vazamento de pequena quantidade de fezes para dentro da cavidade abdominal. Nos grupos LPC e LPC+CTM, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento para indução da sepse, porém receberam soro fisiológico e CTM via intraperitoneal, respectivamente; a dose de CTM foram $1,0 \times 10^6$ cel/ml, 6 horas após a indução da sepse. A parede abdominal foi suturada em duas camadas (músculo e pele) com pontos simples utilizando-se fio nylon 4.0 imediatamente após o

procedimento cirúrgico os animais receberam SF 0,9% pré-aquecido, via intraperitoneal, na dose de 25 ml/Kg de peso corpóreo.

Seis horas após a cirurgia todos os animais passaram a receber antibiótico (ATB) de largo espectro, imipenem-cilastatina sódica (Tienam – Merck Sharp & Dohme), e ressuscitação volêmica com SF 0,9% (25ml/Kg de peso corpóreo), via intraperitoneal, na dose de 14mg/Kg de peso corpóreo. A partir deste momento, receberam ATB e SF 0,9% a cada 12 horas, via subcutânea, até o sacrifício.

3.4. Obtenção, cultivo e expansão das CTM de Cordão Umbilical Humano

Para isolar as células-tronco mesenquimais (CTM) do estroma do cordão umbilical humano ou geleia de wharton, o material foi obtido nos procedimentos pós-parto. O cordão foi transportado em um frasco refrigerado a 4°C, contendo PBS (*Phosphate Buffer Solution*) e antibiótico.

Após a coleta e o transporte, o processamento foi realizado de forma estéril dentro de uma cabina de biossegurança tipo II. O cordão foi lavado com PBS e cortado em pequenos pedaços de aproximadamente 0,5 cm², para logo aderi-los em placas de 6 poços, logo foi adicionado meio de cultura α -MEM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) suplementado com 20% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), penicilina 100U/ml, estreptomicina 100ug/ml (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e foram acondicionadas em incubadora a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5% (ThermoForma, Estados Unidos).

Os *explants* foram mantidos por 15 a 25 dias, o médio de cultura foi trocado 2 a 3 vezes por semana, quando as células atingirem 80% de confluência os *explants* foram retirados e as placas foram tripsinizadas (Gibco, Estados Unidos), finalmente a

cultura foi expandida para garrafas de 25cm² na primeira passagem e em 75 cm² para as outras passagens.

As células foram mantidas com meio de cultura α -MEM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) suplementado com 20% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), penicilina 100UI/ml, estreptomicina 100ug/ml (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e acondicionadas em incubadora a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5% (ThermoForma, Estados Unidos). O meio de cultura foi trocado cada 3 dias e as garrafas foram tripsinizadas quando as células atingirem o 80 a 90% de confluência. As células foram expandidas em cultura até a passagem 4 (P4) e congeladas em nitrogênio líquido. Método Explant.¹⁰⁵ **(Figura 3)**

Figura 3 - Processamento do cordão umbilical. A. O cordão foi cortado em pequenos pedaços para facilitar a extração das artérias e veias. **B.** Método Explant para cultura de CTM.

3.5. Caracterização das células-tronco mesenquimais

3.5.1. Imunofenotipagem

A imunofenotipagem foi determinada pela técnica de citometria de fluxo. As células foram lavadas com tampão PBS e dissociadas da superfície de cultivo mediante tripsinização. As células viáveis foram contadas e processadas em aproximadamente 1×10^5 , para adicionar os anticorpos monoclonais. O painel de anticorpos utilizado foi: CD73-PE, CD105-PE, CD90-FITC, CD45-PerCP-Cy, HLA-DR-APC e CD34-APC (BD, <http://www.bd.com/brasil/>) em uma diluição de 1:100. A aquisição dos dados foram analisados pelo programa BD CellQuest Pro® em um citômetro FACSCalibur (BD, Estados Unidos), para cada amostra foi realizada uma aquisição de 30,000 eventos. Os resultados foram fornecidos em forma de histograma e foram classificadas de forma qualitativa de acordo com a porcentagem de positividade da população selecionada, sendo populações com positividade até 5% considerado como “negativo”, de 5 a 50% considerado como “positivo débil” e maior a 50% considerado como “positivo”.

3.5.2. Ensaios de Diferenciações

O protocolo teve início no momento em que as culturas atingiam aproximadamente 70-80% de confluência (de P0 para P1). Neste momento, todo o meio de cultura foi substituído por um meio de indução próprio para cada diferenciação. Os respectivos meios foram trocados duas a três vezes por semana. As células foram mantidas em incubadora a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5%. Após a indução completa, a diferenciação foi confirmada por meio de colorações.

Diferenciação Adipogênica

Foi utilizado *STEMPRO® Adipocyte Differentiation Basal Medium*, *STEMPRO® Adipogenesis Supplement* (Gibco, Estados unidos) e Gentamicina (10mg/mL), as células foram mantidas aproximadamente 14 dias. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela visualização do acúmulo de vacúolos lipídicos citoplasmáticos através da coloração Oil Red (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

Diferenciação Condrogênica

Foi utilizado *STEMPRO® Chondrocyte Differentiation Basal Medium*, *STEMPRO® Chondrogenesis Supplement* (Gibco, Estados unidos) e Gentamicina (10mg/mL), as células foram mantidas aproximadamente 14 dias. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela visualização de polissacáridos sulfatados através da coloração de Alcian Blue (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

Diferenciação Osteogênica

Foi utilizado *STEMPRO® Osteocyte Differentiation Basal Medium*, *STEMPRO® Osteogenesis Supplement* (Gibco, Estados unidos) e Gentamicina (10mg/mL), as células foram mantidas aproximadamente 21 dias. Para visualizar diferenciação óssea foram realizadas as colorações com Vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

3.6. Medições Renais e metabólicas

3.6.1. *Clearance* de inulina (Taxa de filtração glomerular)

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com tiopental sódico (50 mg/kg), colocados em mesa cirúrgica aquecida e submetidos a traqueostomia, utilizando cateter de polietileno PE-240. A artéria carótida foi canulada com cateter PE-60 para coleta de sangue e controle da pressão arterial e a veia jugular foi canulada para infusão de inulina e outros fluidos. Para coleta de amostras de urina, foi feita uma incisão supra-púbica e a bexiga urinária foi canulada com um cateter PE-240. Inicialmente foi injetado uma dose *priming* de inulina (100 mg/kg) diluída em solução de NaCl 0,9%. Em seguida, foi infundido inulina (10 mg/kg) diluída em solução de NaCl 0,9% através de uma bomba peristáltica com fluxo de 0,04 ml/minuto. Ao total, foram coletadas três amostras de urina a cada intervalo de 30 minutos. As amostras de sangue foram coletadas no início e ao final do experimento. As concentrações de inulina nas amostras de sangue e urina foram determinadas de acordo com método descrito por Führl et al., utilizando a antrona como reagente.¹⁰⁶ (**Figura 4**)

Duas amostras de sangue e três amostras de urina de cada animal foram analisadas para a dosagem de inulina pelo método colorimétrico da antrona, com leitura em espectrofotômetro, comprimento de onda 620 nm. O *clearance* de inulina é dado pela fórmula de depuração já conhecida:

$$\text{Clearance de inulina} = (U_r \text{ in} \times V_{ur}) / P_I \text{ in, onde:}$$

U_r in : concentração urinária de inulina em mg/dl

P_I in : concentração plasmática de inulina em mg/dl

V_{ur} : volume urinário em ml/min

A depuração de inulina foi expressa corrigindo-se por 100 g de peso corpóreo, ou seja:

$$\text{Clearance de inulina} = \text{ml/min} / 100\text{g de peso corpóreo}$$

Figura 4 - Cleareance de Inulina. A. Cateterização da bexiga para poder colher as urinas. **B.** Caterização da traqueia, canulação da artéria carótida e veia jugular do rato.

3.6.2. Função Tubular

Outro grupo de animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais para coleta de urina, sendo que após 24 horas do início da coleta de urina os animais foram sacrificados. As urinas e os plasmas coletados ao final do experimento foram utilizados para análise de creatinina (reação de Jaffé, COBAS® C111 CREATININA

JAFFE, Roche, Suíça), uréia (método cinético UV, COBAS® C111 URÉIA BUN, Roche, Suíça), fósforo (método fotométrico, COBAS® C111 PHOSPHOR, Roche, Suíça), sódio e potássio (método eletrodo íon seletivo). Creatinina (Cr), uréia (U) e fósforo (P), foram quantificados no analisador COBAS® C111 (Roche, Suíça), sódio (Na) e potássio (K) foram quantificados no ABL800® (Radiometer, Dinamarca). Para a avaliação da função tubular foi calculado a fração de excreção (FE) da uréia e de cada eletrólito, de acordo com a seguinte fórmula:

$$FE\ x = (Ur\ x / PI\ x) / (Ur\ Cr / PI\ Cr), \text{ onde:}$$

“x”	: analito de interesse
Ur x	: concentração urinária de “x”
PI x	: concentração plasmática de “x”, na mesma unidade em que foi mensurada a concentração urinária deste analito
Ur Cr	: concentração urinária de creatinina em mg/dl
PI Cr	: concentração plasmática de creatinina em mg/dl

A fração de água (FH₂O), foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$FEH_2O = (P\ Cr / U\ Cr) * 100$$

A osmolalidade foi avaliada na urina de 24h, utilizando-se o osmômetro Advanced® Osmometer, modelo 3D3 (Advanced Instruments, Estados Unidos).

O *clearance* de água livre (CH₂O) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$CH_2O = V_{ur} - V_{ur} (U_{osm} / P_{osm}), \text{ onde:}$$

V_{ur} : Volume urinário (ml/min)

U_{osm} : Osmolalidade urinária (mOsm/Kg H₂O)

P_{osm} : Osmolaridade plasmática (mOsm/Kg H₂O)

3.7. Função Hepática

Os plasmas coletados ao final do experimento de gaiola metabólica foram utilizados para análise da atividade sérica das enzimas alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), as enzimas foram determinadas pelo método cinético UV (COBAS® C111 ALT e COBAS® C111 AST, Roche, Suíça) e quantificadas no analisador COBAS® C111 (Roche, Suíça).

3.8. Sacrifício dos animais

Ao término dos experimentos, os ratos foram sedados profundamente com tiopental sódico via endovenosa.

3.9. Estudo da expressão de proteínas (Western Blotting)

Os rins congelados dos animais foram homogeneizados em uma solução de K-Hepes (200mM Mannitol, 80mM Hepes, 41mM KOH; pH 7.5) contendo inibidores de proteases (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, Estados Unidos) usando um pistilo de teflon (Schmidt and Co, Frankfurt/M, Alemanha). Todo o procedimento foi feito no gelo, com uso de nitrogênio líquido quando necessário. O

homogenato foi então centrifugado (20000 G) por 15 min a 4°C para remoção das células e resíduos celulares. A medida da concentração da proteína foi feita pelo método de Bradford (Bioagency, Brasil).

Western blot

As amostras de proteína foram submetidas à eletroforese em minigel de poliacrilamida. Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, os blots foram tratados com leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T (24,2 g de TRIS base, 29,2g de NaCl, 3,36 g de EDTA, Tween20, pH 7.5) por 1 hora e incubados com anticorpos específicos diluídos em TBS-T. A marcação foi feita através da peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (anti-rabbit, anti-goat, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) usando sistema de quimiluminescência (ECL, Amersham, Reino Unido). A normalização foi feita com a nova hibridização das membranas com o anticorpo para actina (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos).

Semi-quantificação das proteínas - As bandas obtidas foram obtidas no aparelho Alliance 4.2 (UVITEC, Reino Unido) e realizada a densitometria pelo software Image J (NIH, Bethesda, Estados Unidos). As bandas foram normalizadas pela densitometria das bandas originadas pela hibridização da actina.

Foram estudadas as respectivas proteínas: eNOS, TGF- β , Klotho, VEGF, NF- κ B, TLR4, BAX, Bcl-X e AQP2. (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos).

3.10. Estudo Histológico

Os rins e o fígado dos animais foram perfundidos com solução de PBS (NaCl 0,15 M, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4). Em seguida um dos rins e uma parte do fígado foram retirados e seccionados transversalmente em um fragmento de

aproximadamente 0,5cm² para logo ser fixado em solução de 10% de formalina tamponada. Após fixação os tecidos foram incluídos em parafina e cortadas em seções de 4 µm de espessura. Ao final de cada estudo histológico as laminas foram secadas ou embebidas em gradientes maiores de álcool até chegar ao xilol, logo as lâminas foram cobertas com lamínula de vidro, utilizando meio de montagem permount.

3.10.1. Estudo de Imuno-histoquímica e área intersticial relativa em tecido renal

As lâminas de tecido renal foram submetidas à reação de imuno-histoquímica para identificação de macrófagos, de acordo com o seguinte protocolo: os cortes foram incubados overnight à temperatura de 4º C com anticorpo anti-CD68 (CD62P, Abbiotec, Estados Unidos) na diluição 1/100. O produto dessa reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase e a cor desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), na presença de água oxigenada. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris. Para obter o número de células CD68+ na zona tubulointersticial cortical, foram avaliados todos os campos (0.087 mm²/campo) determinado uma média para cada animal.

Os outros cortes de 4µm do tecido renal foram corados com Hematoxilina e Eosina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para análise do comprometimento túbulo-intersticial, avaliando-se a área intersticial relativa do córtex renal. Foram realizados estudos de morfometria para avaliação da expansão da área intersticial, as imagens obtidas pela microscopia óptica foram captadas por meio de vídeo-câmera de luz conectada a um analisador de imagens (QWin; Leica, Wetzlar, Alemanha). Foram analisados 20 campos medindo 37.000 µm² de cada animal e avaliada a fração percentual do córtex ocupado pelo interstício. Em seguida foi determinada a

porcentagem da área intersticial em relação a cada campo, excluindo-se os vasos e glomérulos.

3.10.2. Estudo histoquímico do fígado

As lâminas de tecido hepático foram submetidas à reação histoquímica de PAS (ácido periódico de Schiff) para identificação de locais ricos em glicogênio ou polissacarídeos neutros, contendo grupos 1,-2 glicol. O protocolo usado foi: ácido periódico a 4°C durante 15 minutos e o reagente de Schiff no escuro à temperatura ambiente durante 15 minutos. A avaliação dos resultados da reação foi realizada através da porcentagem dos depósitos de glicogênio em relação a cada campo da área do parênquima hepática marcado. Foram analisados de 10 a 15 campos de cada parênquima e determinando um valor sob expressão dos depósitos. O programa utilizado foi o Image-Pro Plus (MediaCybernetics, Estados Unidos).

3.10.2. Estudo TUNEL do rím

A indução de apoptose por causa da sepse foi avaliada utilizando o método TUNEL (TdT mediated dUTP nick endlabelling). As lâminas foram desparafinadas e processadas segundo o protocolo sugerido pelo fabricante (In Situ Cell Death Detection Kit, POD®, Roche Applied Science, Alemanha), seguindo as etapas: (1) permeabilização da amostra com Proteinase K (20ug/mL) à temperatura ambiente por 30 minutos; (2) bloqueio da peroxidase endógena (H_2O_2 0,3% em metanol à temperatura ambiente por 30 minutos); (3) reação para equilíbrio e inserção de nucleotídeos com a enzima TdT (terminal deoxinucleotidil transferase), reação em câmara úmida a 37°C por 60 minutos; (4) finalização da reação com tampão de parada; (5) detecção com aplicação de 3-3' diaminobenzidina/ H_2O_2 e contracoloração com Verde de Metilo. Para obter o número de

células TUNEL positivas, foram quantificadas células com reação positiva (marrom obscuro) somente nos túbulos da zona cortical. Foram avaliados de 25 a 30 campos ($0.087 \text{ mm}^2/\text{campo}$) determinado uma média para cada animal.

3.11. Análise estatística

Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão ou média $\pm$ desvio padrão. Diferenças entre as médias dos múltiplos parâmetros foram analisadas pelo método One-Way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls e para a análise da curva de sobrevida foi utilizado o teste Log-Rank (Mantel-Cox). O programa estatístico utilizado foi o GraphPrism 5.0. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. Resultados

4.1. Obtenção das células-tronco mesenquimais e análise de sobrevivência

4.1.1. Caracterização das células-tronco mesenquimais

A partir de amostras de cordão umbilical foi processado a geleia de wharton e foram obtidas colônias de células aderidas à superfície das placas de cultura e geralmente entorno dos pedaços da geleia (*explants*).

Em relação aos *explants* de tecido adiposo,¹⁰⁷ as CTM derivadas do estroma do cordão umbilical precisam de maior tempo para sua adesão, migração e proliferação, sendo de 18 a 30 dias o intervalo de tempo em média para nosso procedimento de cultura primária, e de 35 a 45 dias, para chegar até a passagem 4 e a criopreservação das respectivas células. **(Figura 5)** Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), para evidenciar a presença de CTM, é necessário cumprir três critérios como mínimo: morfologia fibroblastoide, imunofenótipo negativo para células de linhagem hematopoiética e a capacidade de diferenciação. Caracterização das CTM. **(Figura 5, 6 e 7)**

Figura 5 - Células-tronco mesenquimais em cultura. A. *Explant* do estroma do Cordão Umbilical (4X), após 18 – 20 dias de cultura primária. **B.** avaliação morfológica (10x), as CTM apresentam uma morfologia fibroblastóide. P1: Passagem 1.

Figura 6 – Imunofenotipagem das Células-tronco (Passagem 3, P3). A imunofenotipagem de moléculas de superfície das células retiradas demonstrou que a população celular total tinha 90.6% de CD73+, 97.1% de células CD90+, 65.3% de células CD105+, 0.262% de CD34+ 0.351% de CD45+, 0.175% de CD3+ e 0.314% de HLA-DR+.

Figura 7 - Diferenciação das Células-tronco. **A.** Diferenciação adipogênica, lipídios corados em vermelho **B.** Diferenciação condrogênica, glicopeptídeos sulfatados são evidenciados de cor turquesa, característica dos condrócitos **C.** Diferenciação Osteogênica, cristais de cálcio são evidenciados de cor vermelho refringente, característica dos osteócitos.

4.1.2. Análise da sobrevida

Os animais com sepse tratados com CTM apresentaram sobrevida maior que aqueles que não receberam tratamento ($p=0,04$) (**Figura 8**)

Figura 8 - Curva de sobrevida. $n = 9$ animais/grupo.

4.2. Avaliação Renal

4.2.1. Taxa de Filtração Glomerular

A sepse reduziu significativamente a filtração glomerular dos ratos avaliados após 24h da indução, tanto pela análise do *clearance* de inulina quanto pelo *clearance* de creatinina (resultado não mostrado). Os animais com sepse tratados com CTM após 6h da indução da sepse apresentaram melhora na filtração glomerular em relação aos animais sem tratamento, analisados pelo *clearance* de inulina. O tratamento com as CTM, se demonstrou benéfico em relação ao ritmo de filtração glomerular nesses animais. (Tabela 3 e Figuras 9).

Tabela 3 - Avaliação da Taxa de Filtração Glomerular

	SHAM	LPC	LPC + CTM
<i>Clearance</i> inulina (ml/min/100g peso)	0,87 ± 0,03	0,26 ± 0,03**	0,90 ± 0,08##

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10⁶ CTM após 6h da injúria. Valores expressos em média±erro padrão. *n* = 7 animais/grupo. **: *p*<0,0001 vs SHAM; #: *p*<0,0001 vs LPC.

Figura 9 - Taxa de filtração glomerular (TFG), avaliada 24 horas após a indução da sepse, aferida pelo clearance de inulina. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10^6 CTM após 6h da injúria. $n = 7$ animais/grupo. **: $p < 0,0001$ vs SHAM; ##: $p < 0,0001$ vs LPC.

4.2.2. Função tubular renal

A sepse acarretou em uma importante disfunção tubular nos animais, sendo que a fração de excreção (FE) de diversos eletrólitos como sódio, uréia e fósforo se mostraram aumentadas em relação aos valores esperados nos ratos controle/SHAM. A FEK se mostrou aumentada, mas não foi significativo em relação ao grupo controle e grupo com sepse; por outro lado, encontramos uma maior FEH₂O, diminuição significativa da osmolalidade, aumento do débito urinário e diminuição na retenção de água livre. O tratamento com CTM melhorou a função tubular, demonstrado pela significativa diminuição das frações de excreção de íons e água em relação aos animais com sepse e a manutenção do clearance de água livre. **(Tabela 4 e Figura 10 e 11).**

Tabela 4 - Avaliação da função tubular renal.

	SHAM	LPC	LPC + CTM
FENa (%)	0,10 ± 0,01	1,69 ± 0,56*	0,67 ± 0,12 [#]
FEK (%)	8,51 ± 0,26	16,1 ± 4,02	10,0 ± 1,60
FEU (%)	26,6 ± 1,37	74,0 ± 11,4*	49,7 ± 3,43 [#]
FEH₂O (%)	0,65 ± 0,09	4,77 ± 1,34*	1,53 ± 0,26 [#]
Osmolalidade (mOsm)	912,3 ± 60,9	368,0 ± 42,6**	620,4 ± 92,7* [#]
Débito urinário (ml/min)	0,011 ± 0,001	0,028 ± 0,002**	0,024 ± 0,005*
Clearance de água livre (ml/min)	-0,02 ± 0,001	-0,006 ± 0,003*	-0,02 ± 0,004 [#]

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10⁶ CTM após 6h da injúria. Valores expressos em média ± erro padrão. *n* = 7 animais/grupo. *: *p*<0,05 vs SHAM; **: *p*<0,0001 vs SHAM; #: *p*<0,05 vs LPC.

Figura 10 - Função tubular avaliada após 24 horas da indução da sepse, aferida pela fração de excreção (FE). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10^6 CTM após 6h da injúria. $n = 7$ animais/grupo. * $p < 0,05$ vs SHAM; **: $p < 0,0001$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

Figura 11 - Função tubular avaliada após 24 horas da indução da sepse, aferida pela Osmolalidade (A), Débito urinário (B) e Clearance de água livre (C). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10^6 CTM após 6h da injúria. $n = 7$ animais/grupo. * $p < 0,05$ vs SHAM; ** $p < 0,0001$ vs SHAM; # $p < 0,05$ vs LPC.

4.2.3. Níveis plasmáticos de eletrólitos

Os níveis plasmáticos de eletrólitos não apresentaram alterações significativas, tanto nos animais com sepse, quanto aos animais tratados com CTM. (**Tabela 5 e Figura 12**).

Tabela 5 - Avaliação de eletrólitos plasmáticos

	SHAM	LPC	LPC + CTM
P Na (mEq/L)	140 ± 1,62	137 ± 1,35	137 ± 1,32
P K (mEq/L)	4,2 ± 0,11	4,98 ± 0,43	4,17 ± 0,20
P P (mg/dL)	7,43 ± 0,29	8,08 ± 0,39	7,48 ± 0,32

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10⁶ CTM, 6h após a injúria. Valores expressos em média ± erro padrão. *n* = 7 animais/grupo

Figura 12 - Eletrólitos plasmáticos, avaliados após 24 horas da indução da sepse.

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10^6 CTM, 6h após a injúria. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ animais/grupo.

4.2.5. Histologia renal

A sepse é um processo hiperinflamatório caracterizado pela mobilização e infiltração de leucócitos. No nosso modelo avaliamos esse processo mediante a medição da área intersticial relativa renal (AIR) e pela infiltração de macrófagos, mediante a imunolocalização de células CD68 positivas no compartimento túbulo-intersticial do tecido renal. Como era esperado o grupo LPC apresentou um aumento significativo na AIR e no número de macrófagos, quando comparado ao grupo SHAM (LPC $9,76 \pm 0,41$ vs SHAM $6,54 \pm 0,56$ %; LPC $6,58 \pm 0,37$ vs SHAM $2,86 \pm 0,22$ células positivas/ $0,087\text{mm}^2$; $p < 0,05$), respectivamente. O tratamento com CTM reduziu significativamente a AIR e o número de células positivas (LPC $9,76 \pm 0,41$ vs LPC + CTM $6,72 \pm 0,48$ %; LPC $6,58 \pm 0,37$ vs LPC + CTM $3,8 \pm 0,55$ células positivas/ $0,087\text{mm}^2$; $p < 0,05$), respectivamente. (**Figura 13 e 14**).

Figura 13 – Área intersticial relativa renal e número de células CD68 positivas/ $0,087\text{mm}^2$ do compartimento túbulo-intersticial do tecido renal, avaliada 24 horas após a indução da sepse. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10^6 CTM, 6h após a injúria. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ animais/grupo. * $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

Figura 14 - Histologia renal e imunolocalização de células CD68+/0,087mm², avaliada 24 horas após a indução de sepse. A. SHAM. B. LPC. C. LPC + CTM. D. SHAM, o grupo apresenta alguma marcação de macrófagos residentes do tecido renal. E. LPC, o grupo apresentou um incremento importante de macrófagos. F. LPC + CTM, o tratamento com CTM conseguiu diminuir o número de macrófagos no compartimento túbulo-intersticial. Seta laranja: células CD68+. A, B, C (Coloração Hematoxilina e eosina).

4.3. Avaliação Hepática

4.3.1. Avaliação dos níveis séricos das enzimas hepáticas

Como já é conhecido os animais com sepse apresentam lesão hepática. No nosso modelo de sepse, os animais apresentaram um aumento significativo das enzimas hepáticas, tanto a alanina transaminase (ALT), quanto a aspartato transaminase (AST). O tratamento com CTM, reduziu o aumento da ALT, mas não foi significativo; no entanto, o tratamento diminuiu significativamente o nível da AST, porém ainda elevado em relação ao SHAM (**Tabela 6 e Figura 15**).

Tabela 6. Níveis séricos das enzimas hepáticas.

	SHAM	LPC	LPC + CTM
ALT (UI/L)	29,8 ± 4,19	48,8 ± 4,76*	39,6 ± 4,19
AST (UI/L)	78,25 ± 5,54	205,9 ± 25,2*	142,5 ± 11,4* #

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10⁶ CTM, 6h após a injúria. Valores expressos em média ± erro padrão. *n* = 7 animais/grupo. *: *p*<0,05 vs SHAM; #: *p*<0,05 vs LPC.

Figura 15 - Níveis séricos da atividade das enzimas hepáticas, avaliados após 24 horas da indução da sepse. A. Alanina transaminase (ALT) **B.** Aspartato transaminase (AST). SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10^6 CTM, 6h após a injúria. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ animais/grupo. * $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

4.3.2. Histologia hepática

Frente a uma injúria o fígado libera uma série de componentes metabólicos, na avaliação plasmática pode ser evidenciado pelo aumento de enzimas, na avaliação histológica, pela morfologia celular e pela quantidade dos depósitos de glicogênio. O grupo LPC apresentou uma diminuição significativa no escore de depósitos de glicogênio quando comparado ao grupo SHAM (LPC $2,24 \pm 1,19$ vs SHAM $29,8 \pm 2,91$; $p < 0,0001$). No entanto o tratamento com CTM manteve relativamente os depósitos de glicogênio em relação ao grupo séptico, embora foi significativamente reduzido em relação ao grupo SHAM (LPC $2,24 \pm 1,19$ vs LPC + CTM $11,1 \pm 1,54$; $p < 0,05$ e SHAM $29,8 \pm 2,91$ vs LPC + CTM $11,1 \pm 1,54$; $p < 0,0001$) (**Figura 16 e 17**).

Figura 16 – Avaliação dos depósitos de glicogênio hepático. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10^6 CTM, 6h após a injúria. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ animais/grupo. **: $p < 0,0001$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

Figura 17 – Histologia hepática, avaliada 24 horas após a indução de sepse. A e D. SHAM. B e E. LPC. C e F. LPC + CTM. SHAM, o grupo apresenta normais quantidade de glicogênio (Cor fúcsia). LPC, o grupo apresentou uma diminuição importante de depósitos de glicogênio. LPC + CTM, o tratamento com CTM conseguiu manter alguns depósitos. **A, B e C** (40x); **D, E e F** (20x) (Coloração PAS: Ácido periódico de Schiff).

4.4. Avaliação molecular renal - endotelial

4.4.1. Expressão de marcadores anti-inflamatórios e protetores do endotélio renal

Marcadores como o TGF- β 1 e o VEGF são proteínas envolvidas no processo anti-inflamatório. Nos animais com sepse não encontramos diferenças significativas em relação a grupo SHAM, porém no grupo tratado com CTM, se evidenciou um aumento significativo.

Marcadores de proteção endotelial, avaliados pela presença de eNOS e VEGF, encontramos uma redução significativa da enzima nos animais com sepse em relação ao grupo SHAM. O tratamento com CTM restabeleceu a expressão da enzima eNOS semelhante aos níveis encontrados no grupo SHAM.

É sabido que a expressão da proteína klotho, na IRA isquêmica, está diminuída em tecido renal. Demonstramos que há redução na expressão da proteína klotho em tecido renal na sepse. Demonstramos também que as CTM conseguiram restabelecer ou manter a expressão. As CTM desempenham um importante efeito nefroprotetor no mecanismo de injúria induzido pela sepse (**Tabela 7 e Figura 18**).

Tabela 7 - Marcadores anti-inflamatórios e protetores do endotélio renal.

	SHAM	LPC	LPC + CTM
TGF-β1 (%)	100,0 $\pm$ 2,73	106,2 $\pm$ 3,22	118,9 $\pm$ 4,15**
VEGF (%)	98,4 $\pm$ 3,54	141,6 $\pm$ 2,13	208,7 $\pm$ 24,4***
eNOS (%)	102,5 $\pm$ 2,50	49,0 $\pm$ 2,08**	97,4 $\pm$ 2,79##
Klotho (%)	100,0 $\pm$ 3,16	43,3 $\pm$ 5,52**	65,25 $\pm$ 3,45***

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a LPC; LPC + CTM: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM após 6h da injúria. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ animais/grupo. *: $p < 0,05$ vs SHAM; **: $p < 0,0001$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC; ###: $p < 0,0001$ vs LPC.

Figura 18 - Marcadores anti-inflamatórios e protetores do endotélio renal, avaliada 24 horas após a indução da sepse. A. TGF-β1. B. VEGF. C. eNOS. D. Klotho. Os dados são expressos como média ± erro padrão, os grupos LPC e LPC + CTM foram quantificados em relação ao controle. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a LPC; LPC + CTM: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM após 6h da injúria. $n = 7$ animais/grupo. *: $p < 0,05$ vs SHAM; **: $p < 0,0001$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC; ##: $p < 0,0001$ vs LPC.

4.4.2. Expressão de marcadores mediadores da inflamação

Como já descrito na introdução, o TLR4 e o NF-kB são moléculas importantes na sinalização da inflamação. Nos animais com sepse, encontramos um aumento significativo da expressão do NF-kB e um ligeiro aumento, embora não significativo, do TLR4. O tratamento com CTM diminuiu a expressão desses marcadores, principalmente no NF-kB. Esse resultado sugere que as CTM modulam a inflamação regulando a expressão do NF-kB. Esse efeito provavelmente está envolvido direta ou indiretamente com a expressão das moléculas anti-inflamatórias. **(Tabela 8 e Figura 19).**

Tabela 8 - Marcadores mediadores de inflamação

	SHAM	LPC	LPC + CTM
TLR4 (%)	100,0 ± 6,40	111,5 ± 5,62	104,7 ± 5,68
NF-kB (%)	98,0 ± 4,16	164,8 ± 3,86**	94,8 ± 3,35##

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a LPC; LPC + CTM: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM após 6h da injúria. Valores expressos em média ± erro padrão. *n* = 7 animais/grupo. *: $p < 0,05$ vs SHAM; **: $p < 0,0001$ vs SHAM; ##: $p < 0,0001$ vs LPC.

Figura 19 - Marcadores mediadores da inflamação, após 24 horas de indução da sepse. A. TLR4. B. NF-kB. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão, os grupos LPC e LPC + CTM foram quantificados em relação ao controle. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a LPC; LPC + CTM: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM após 6h da injúria. $n = 7$ animais/grupo. **: $p < 0,0001$ vs SHAM; ##: $p < 0,0001$ vs LPC.

4.4.3. Expressão de marcadores reguladores de apoptose

Um dos principais eventos que participa da disfunção orgânica na sepse é a ativação da cascata de apoptose. Bcl-X e BAX são moléculas que desempenham um papel importante na regulação da apoptose; o primeiro como agente anti-apoptótico e o segundo como pró-apoptótico. Demonstramos haver um aumento significativo de BAX, e um aumento discreto de Bcl-X. No entanto, o tratamento com CTM reduziu significativamente a expressão de BAX e aumentou significativamente a expressão do Bcl-X. Esse resultado pode indicar que as CTM possuem um efeito anti-apoptótico durante a sepse. **(Tabela 9 e Figura 20).**

Tabela 9 - Marcadores reguladores de apoptose.

	SHAM	LPC	LPC + CTM
Bcl-X (%)	100,0 ± 2,66	197,8 ± 30,8	293,2 ± 59,7*
BAX (%)	95,0 ± 5,0	118,3 ± 4,41*	95,2 ± 2,35#

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a LPC; LPC + CTM: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM após 6h da injúria. Valores expressos em média ± erro padrão. *n* = 7 animais/grupo. *: *p*<0,05 vs SHAM; **: *p*<0,0001 vs SHAM; #: *p*<0,05 vs LPC; ##: *p*<0,0001 vs LPC.

Figura 20 - Marcadores reguladores de apoptose, após 24 horas de indução da sepse. A. Bcl-X. B. BAX. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão, os grupos LPC e LPC + CTM foram quantificados em relação ao controle. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a LPC; LPC + CTM: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM após 6h da injúria. $n = 7$ animais/grupo. *: $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

4.4.4. TUNEL

A sepse causa uma injúria sistêmica, como consequência do dano existe um aumento de apoptose em todas as células em geral, pela histologia pode ser evidenciado pela reação TUNEL, o que indica a presença de células apoptóticas. O grupo LPC apresentou um aumento significativo no número de células TUNEL positivas quando comparado ao grupo SHAM (LPC $52,4 \pm 4,32$ vs SHAM $2,9 \pm 0,97$; $p < 0,05$). No entanto o tratamento com CTM reduziu relativamente o número de células TUNEL positivas em relação ao grupo séptico, embora foi significativamente aumentado em relação ao grupo SHAM (LPC $52,4 \pm 4,32$ vs LPC + CTM $27,48 \pm 7,42$; $p < 0,05$ e SHAM $2,9 \pm 0,97$ vs LPC + CTM $27,48 \pm 7,42$; $p < 0,05$). (**Figura 21 e 22**).

Figura 21 – Células TUNEL positivas/0,087mm² do compartimento túbulo-intersticial do tecido renal, avaliada 24 horas após a indução da sepse. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10^6 CTM, 6h após a injúria. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ animais/grupo. * $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

Figura 22 – Reação TUNEL para avaliação de apoptose, avaliada 24 horas após a indução de sepse. A e D. SHAM. B e E. LPC. C e F. LPC + CTM. SHAM, o grupo apresenta poucas quantidades de células em apoptose. LPC, o grupo apresentou um aumento significativo. LPC + CTM, o tratamento com CTM conseguiu regular a apoptose. **A, B e C (40x); D, E e F (20x).** **Seta amarela:** Células ou túbulos em apoptose (Reação TUNEL + Verde Metilo).

4.4.4. Expressão de AQP2

A injúria renal causada pela sepse, altera as funções de concentração da urina. A Aquaporina 2 é um transportador que desempenha um papel importante na retenção de água. Demonstramos haver uma diminuição significativa de AQP2 na sepse. No entanto, o tratamento com CTM manteve expressão de AQP2. (**Tabela 10 e Figura 23**).

Tabela 10 - Expressão de Aquaporina 2.

	SHAM	LPC	LPC + CTM
AQP2 (%)	100,0 ± 1,72	74,7 ± 4,92*	112,3 ± 11,4 [#]

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a LPC; LPC + CTM: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM após 6h da injúria. Valores expressos em média ± erro padrão. *n* = 7 animais/grupo. *: *p*<0,05 vs SHAM; #: *p*<0,05 vs LPC.

Figura 23 - Expressão de Aquaporina 2. Os dados são expressos como média ± erro padrão, os grupos LPC e LPC + CTMg foram quantificados em relação ao controle. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a LPC; LPC + CTM: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM após 6h da injúria. *n* = 7 animais/grupo. *: *p*<0,05 vs SHAM; #: *p*<0,05 vs LPC.

5. Discussão

O presente estudo demonstrou que a administração de células-tronco mesenquimais derivadas da geleia de wharton (GW) do cordão umbilical (CTMc) atenua a injúria renal, mantém os níveis das enzimas hepáticas, reduz a apoptose, protege o endotélio e diminui a inflamação; em um modelo de sepse de ligadura e punção do ceco, em ratos. O estudo tentou mimetizar a ocorrência da doença o mais próximo possível como na prática clínica, portanto os animais com sepse induzida receberam antibioticoterapia de amplo espectro e expansão volêmica, e o tempo de início desse tratamento foi de maneira similar o que acontece nas UTI, 6 horas como tempo em média desde o início da sepse até seu diagnóstico e tratamento.

Para isso, as CTM foram isoladas a partir do cordão umbilical obtido de puérperas voluntárias do Hospital Universitário. As células foram cultivadas pelo método *Explant*, método baseado no princípio de migração e a aderência das CTMs ao plástico.^{97,105} É conhecido que existem muitas linhagens celulares na GW, portanto antes de encontrar colônias fibroblásticas provavelmente referente às CTM, encontramos algumas células contaminantes de linhagem diferente, assim como os referido às HUVECS, células hematopoiéticas e pericitos,¹⁰⁷ então a fim de se retirar os contaminantes foi necessário trocar o meio de cultura a cada semana completando 21 dias (ou até mais), já que geralmente essas células proliferam precocemente, portanto é necessário seu descarte. As CTM provenientes dos *explants* de GW necessitam de maior tempo para migrar e aderir ao plástico a diferença das CTM provenientes dos *explants* de tecido adiposo, essa característica provavelmente se deve a que as CTM da GW, não entram facilmente ao período de divisão celular, além que elas possuem baixa atividade da telomerase, o que significa que são mais precoces.¹⁰⁵ Da literatura podemos inferir que o tempo se converte em uma estratégia para poder purificar essas células, em esse sentido fizemos mais de 2 passagens para poder caracteriza-las.¹⁰⁸

Todas as células caracterizadas neste estudo pertencem à terceira ou à quarta passagem. Essas células apresentaram 90.6% de expressão de CD73+, 97.1% de CD90+, 65.3% de células CD105+, 0.262% de CD34+, 0.351% de CD45+, 0.175% de CD3+ e 0.314% de HLA-DR+, embora o CD105+ tenha uma baixa expressão, os outros marcadores apresentaram uma expressão maior do 90%, confirmando o fenótipo das CTM, tal como descrito na literatura.^{66,107} Além disso, as nossas células apresentaram a morfologia fibroblastóide e conseguiram se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos, estes dados se correlacionam com o estudo feito por Kern. S. et. al.¹⁰⁹ De acordo com os nossos resultados podemos afirmar que as células utilizadas no tratamento da sepse, são CTM.

Sobre nosso modelo experimental de sepse em ratos, como já descrito na literatura, é o modelo mais próximo da doença em humanos. Há ainda na literatura grande discussão sobre o modelo, como número de punções, distância no ceco para a ligadura e muitas variáveis que são pontos críticos.⁴⁵ Estas diferenças acarretam no nível de gravidade do quadro da sepse e na sobrevivência dos animais, foi assim que nós decidimos por fazer a ligação do ceco na parte central, entre a válvula ileocecal e o final do ceco, e 2 punções na parte distal do ceco com a finalidade de obter uma sepse moderada ou de grau médio.⁴⁶ No entanto, neste modelo, também existem diversos outros fatores que podem influenciar os resultados, como a idade, sexo, linhagem genética do animal, a heterogeneidade da resposta inflamatória, intervenções terapêuticas, entre outros fatores.⁴⁴ Sob essa perspectiva, tentamos padronizar e mimetizar este modelo LPC semelhante ao que ocorre na prática clínica, administrando antibiótico e levando a expansão volêmica do animal (após o procedimento cirúrgico e durante o tratamento), a expansão foi realizada com o fim de repor as perdas hídricas já que os animais estavam submetidos a laparotomia abdominal com a cavidade aberta durante o ato operatório. A avaliação funcional e coleta de amostras foram 24 horas após de indução, já que a esse tempo se consegue

uma melhor discriminação dos parâmetros, os animais estão mais disponíveis para análise e permite comparar os dados com outros estudos semelhantes.^{46,52,74,85,110} A mortalidade no grupo LPC foi maior que 30%; dados semelhantes ao encontrado em unidades de terapia intensiva. O nosso modelo induz uma sepse moderada, pois embora tenham recebido antibióticos e expansão volêmica, manifestaram algumas disfunções orgânicas (renal e hepática).^{4,6}

A escolha da dose das CTM foi baseada no estudo de Gonzales-Rey E, e col.¹¹⁰ Estes autores relatam que o efeito benéfico das CTM em ratos e camundongos se evidencia com a administração de mais de um milhão células. Iniciamos o estudo administrando as células por via endovenosa (em veia caudal) semelhante aos alguns autores,^{73,102,110} entretanto, não encontramos diferenças entre o grupo LPC e o grupo tratado. Provavelmente estas células eram grandes e não estavam suficientemente diluídas para atingir a corrente sanguínea, ficando na veia caudal em grumos. Quando passamos a administrar por via intraperitoneal, os achados (como mostrados aqui) foram extremamente animadores.

Em relação ao tratamento da sepse e a sobrevida, demonstramos que a infusão de CTM melhorou a sobrevida dos animais tratados; porém, ainda houveram óbitos. Estes animais são Wistar, não-singênicos, portanto apresentam uma heterogeneidade muito grande; semelhante ao que ocorre em pacientes.

Como já é descrito na literatura, a sepse é uma das maiores causas de IRA. Quando a sepse evolue com IRA, a mortalidade é extremamente alta. Portanto, avaliar a função renal e os mecanismos que possam estar envolvidos foi de grande importância para o nosso estudo. Demonstramos que as CTM melhoraram a função renal nos animais com sepse. Demonstramos melhora da função renal medida pelo *clearance* de inulina como também pelo *clearance* de creatinina, embora saibamos que a medida da creatinina, na sepse, pode não ser fidedigna como medida de função

renal (resultado não mostrado).¹¹¹ Os animais do grupo LPC apresentaram uma elevação das FEs, sendo curioso observar que, neste mesmo modelo possa haver diminuição das FEs, como outros trabalhos sugerem,^{112,113} mas este aumento das FEs pode sugerir disfunção tubular. A lesão renal no grupo séptico também foi evidenciado pelo aumento do espaço intersticial, o que indica uma maior infiltração de leucócitos, dado que também foi aferido principalmente pelo aumento da infiltração de macrófagos, como já descrito.¹¹¹⁻¹¹³ Na histologia não encontramos alterações celulares significativas, sabe-se que não há necrose tubular aguda como é evidenciado na literatura e como nós mesmos demonstramos.¹¹¹ Por tanto a sepse levou a uma alteração significativa da função tubular medida pelas FEs, além de uma diminuição da osmolalidade, aumento do débito urinário e uma diminuição na retenção de água livre (clearance de água livre), desses dados podemos aferir que os animais sépticos sem tratamento apresentaram um déficit de concentração urinária e prováveis alterações nos canais transportadores de água e eletrólitos, assim como foi evidenciado na alteração da expressão de AQP2. No entanto o tratamento com as células normalizou as FEs e outros parâmetros semelhante aos animais controle, assim como foi evidenciado no efeito da regulação da expressão de AQP2.

Na avaliação hepática, demonstramos que existe uma lesão neste nosso modelo de sepse. Esta afirmação foi evidenciada pelo aumento significativo das transaminases plasmáticas nos animais sépticos (em duas vezes a concentração de ALT e em três vezes a AST), dados que estão relacionados com uma lesão hepatocelular de origem infecciosa. O tratamento com CTM demonstrou ser efetivo na redução dessas enzimas, principalmente na concentração de AST, resultado que pode ser comparado com Chang CL, et. al.¹⁰³ Alguns estudos sugerem que a proteção induzida pelas CTM na lesão hepática induzida pela sepse possa ser por diminuição da infiltração de leucócitos,^{77,110} modulação da resposta imune e diminuição da apoptose nas células hepáticas.¹⁰²

Visando compreender a fisiopatologia da lesão renal na sepse e as vias de proteção das CTM, estudamos os mediadores anti-inflamatórios e os protetores do endotélio que estão muito comprometidos no processo de imunossupressão e/ou reparação. A expressão de TGF- β está envolvido como parte desses processos, embora também sabe-se que essa proteína também está envolvida na fibrose e alguns mecanismos de apoptose em diversas doenças, dados que o converte em multifuncional.³⁹ No entanto o tratamento com CTM mostrou um aumento significativo do TGF- β 1, indicando um provável efeito anti-inflamatório, evento que também é relacionado pelo aumento significativo da expressão de VEGF.³⁹ A expressão de estas moléculas no tratamento com CTM poderiam estar envolvidos na polarização aguda da resposta imune, para chegar a uma afirmação precisaríamos estudar o perfil imunológico de interleucinas assim como a expressão das células T reguladoras, tanto em sangue como nos tecidos linfóides.^{115, 116}

O nosso modelo séptico evidenciou uma queda na expressão do eNOS, mostrando assim que se teve uma lesão a nível do endotélio. O VEGF, além de ser uma molécula anti-inflamatória, também protege o endotélio e favorece a revascularização, acreditamos que associado à manutenção da expressão do eNOS tal e como acontece nos animais tratados, a terapia celular com CTM, protege o endotélio frente à sepse.

A proteína klotho é um possível e importante biomarcador de lesão renal.⁴⁰ De forma semelhante a outros resultados de nosso grupo, nosso modelo de sepse induzida conseguiu diminuir a expressão do klotho em tecido renal evidenciando uma lesão nesse tecido, no entanto a terapia celular manteve a expressão dessa proteína, por tanto podemos aferir que o tratamento diminuiu a injúria ou lesão renal causada pela sepse. Pelas propriedades anti-apoptóticas, anti-estresse oxidativo e imunomodulador da proteína klotho, pode-se indicar que a manutenção dessa proteína favorece a recuperação do organismo frente à sepse.⁴⁰ Segundo a literatura e

características das CTM, podemos afirmar que estas células são extremamente jovens ou precoces e além foi demonstrado que elas expressam klotho na sua membrana, dados que conferem sua baixa atividade da telomerase, provavelmente no tratamento com CTM exista alguma conexão desse klotho externo com a manutenção ou restauração do klotho renal, porém ainda teremos que estudar os mecanismos envolvidos.¹¹⁷

Em contrapartida, na tentativa de diminuir a fase inflamatória, as CTM regularam significativamente a expressão do NF-kB, e a expressão do TLR4 (dados estatisticamente não significativos). Estas proteínas são os principais mediadores da sepse; a regulação pode ter sido em decorrência da modulação imunológica causada pelas CTM. Um estudo revelou que a interação das CTM com macrófagos residentes produz a liberação de TSG-6, TGF- β 1, IL-10, PGE2 e outras moléculas que estão regulando a sinalização do NF-kB e diminui a expressão de TNF- α .^{37,39,61,83,102,110} Vale mencionar que a presença de klotho poderia estar agindo também na redução da expressão do NF-kB, tal e como mostrou Maekawa Y. et. al.⁴³ A estimulação de genes que levam aumento da produção de interleucinas é decorrente de NF-kB,¹¹⁴ este funciona como um fator de transcrição com entrada no núcleo da célula para ativação gênica das interleucinas. Ainda teremos que estudar a ativação de NF-kB e sua entrada no núcleo celular.¹¹⁸

Na fase inicial da sepse são ativados os mecanismos de apoptose devido à injúria e o estresse oxidativo.^{12,52} Nosso modelo demonstrou que as 24 horas de indução de sepse se teve um aumento significativo da expressão do BAX, indicando um ambiente apoptótico, mas o tratamento demonstrou que as CTM modularam a expressão do Bcl-x/BAX, tornando-se assim um agente anti-apoptótico. As CTM têm a capacidade de resistir à apoptose, isto é de suma importância na sepse, conferindo uma grande resistência para poder agir frente a um ambiente com grande estímulo à apoptose.⁸⁵ Yagi H, e col também demonstraram que administração de CTM durante

endotoxemia, em ratos, reduz de forma significativa o número de células apoptóticas em tecido renal e pulmonar.⁶¹ Acreditamos que assim como em tecido renal, as CTM devem também reduzir a expressão de proteínas apoptóticas em outros tecidos, justificando assim a melhora da mortalidade, como também demonstrado na literatura.^{60,74,110}

Segundo a literatura as CTM, indistintamente da fonte, possuem vários efeitos benéficos em diversas doenças, assim como em patologias inflamatórias como a sepse, no presente estudo mostramos que as CTM da GW apresentam as mesmas propriedades em relação às CTM de outras fontes. Já foi evidenciado que o uso do cordão umbilical como fonte de CT é mais acessível, eficiente e seguro em termos práticos e éticos, foram feitas comparações entre CTM de distintas fontes mostrando maior poder benéfico para as CTM da GW.¹⁰⁹ Com o descrito acreditamos que o uso dessas células como tratamento na sepse, pode ser um importante agente benéfico para ser tomado em conta, vale ressaltar por suas propriedades anti-inflamatórias e anti-apoptóticas, além por sua capacidade de restaurar a função renal, hepática e endotelial frente à injúria. **(Figura 24)**

No entanto, muito ainda tem que se estudar no uso das CTM na sepse; sua participação na função cardíaca, pulmonar, neuronal e principalmente na interação destas células com o sistema imunológico. Muito ainda terá que ser estudado quanto aos possíveis efeitos colaterais destas células em um estado de sepse. A dose, a via de administração, o momento e o exato mecanismo terão ainda que ser bem sedimentados para o possível estudo clínico em pacientes.

Figura 24 - Ação das CTM derivadas de geleia de Warton de cordão umbilical humano em modelo experimental de sepse (ligadura e punção do ceco).

6. Conclusão

As células-tronco mesenquimais derivadas da geleia de Wharton são capazes de melhorar a sobrevida e proteger da disfunção renal e sistêmica durante a sepse em modelo animal.

7. Referencias

1. MARSHALL, J.C. Sepsis: rethinking the approach to clinical research. *Journal of leukocyte biology*. 2008;83(3):471-482.
2. Thomas, L. Germs. *New England journal medicine*. 1972;287(1):553-555.
3. Bone RC. Sepsis, the septic syndrome and multi-organ failure: early diagnosis. *The southern african journal of critical care*. 1990;6(1):9-12.
4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ; ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992;101(1):1644–1655.
5. Dellinger P, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013;41(2).
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003;31(1):1250–1256.
7. Arabi Y, Alamry A, Levy MM, Taher S, Marini AM. Improving the care of sepsis: Between system redesign and professional responsibility: A roundtable discussion in the world sepsis day, September 25, 2013, Riyadh, Saudi Arabia. *Annals Thoracic Medicine*. 2014;9(3):134-137.
8. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E; Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES Study). *Crit Care*. 2004;8(4):251-260.

9. Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, Tura BR, Silva CL, Cal RG, Beer I, Michels V, Safi J, Kayath M, Silva E. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(5):425-434.
10. Sales Júnior JA, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, Friedman G, Silva OB Dias MD, Koterba E, Dias FS, Piras C, Luiz RR. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *Revista brasileira terapia intensiva*. 2001(1):9-17.
11. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*. 2007;35(10):2408-2416.
12. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis *Nat Rev Immunol*. 2008;8(10):776-87.
13. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917): 885–891.
14. Landry D. W. & Oliver, J. A. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N. Engl. J. Med*. 2001;345(1):588–595.
15. Japiassú AM, Santiago AP, d'Avila JC, Garcia-Souza LF, Galina A, Castro Faria-Neto HC, Bozza FA, Oliveira MF. Bioenergetic failure of human peripheral blood monocytes in patients with septic shock is mediated by reduced F1Fo adenosine-5'-triphosphate synthase activity. *Crit Care Med*. 2011;39(5):1056-63.
16. Morrell ED, Kellum JA, Pastor-Soler NM, Hallows KR. Septic acute kidney injury: molecular mechanisms and the importance of stratification and targeting therapy. *Crit Care*. 2014;18(5):501.
17. Ergin B, Kapucu A, Demirci-Tansel C, Ince C. The renal microcirculation in sepsis. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(2):169-177.

18. Langenberg, C., Bagshaw, S.M., May, C.N., Bellomo, R. The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review. *Crit Care*. 2008;12(2):R38.
19. Hartmann M, Ozlügedik S, Peters J. Thiopental inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor expression. *Anesth Analg*. 2009 Jul;109(1):109-13.
20. Minemura M, Tajiri K, Shimizu Y. Liver involvement in systemic infection. *World J Hepatol*. 2014;6(9):632-642.
21. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukocyte Biol*. 2007;81(1):1–5.
22. Mifsud EJ, Tan AC, Jackson DC. TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease. *Front Immunol*. 2014;5(1):79.
23. Arcaroli J, Silva E, Maloney JP, et al. Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor-kappaB activation and worse outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1335–1341.
24. Vincent JL, Abraham E. The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(3):256-263.
25. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(10):791-800.
26. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): Nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(4):331-42.
27. Wang W, Mitra A, Poole B, Falk S, Lucia MS, Tayal S, Schrier R. Endothelial nitric oxide synthase-deficient mice exhibit increased susceptibility to endotoxin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287(5):F1044-8.
28. Piepot HA, Boer C, Groeneveld AB, Van Lambalgen AA, and Sipkema P. Lipopolysaccharide impairs endothelial nitric oxide synthesis in rat renal arteries. *Kidney Int*. 2000;57(1):2502–2510.

29. Lopez A, Lorente JA, Steingrub J. Multiple-center, randomized, placebo controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: Effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 2004;32(1):21–30.
30. Liaudet L, Rosenblatt-Velin N, Pacher P. Role of peroxynitrite in the cardiovascular dysfunction of septic shock. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013;11(2):196-207.
31. Boos CJ, Goon PK, Lip GY. The endothelium, inflammation, and coagulation in sepsis. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;79(1):20–22.
32. Barrett LK, Singer M, Clapp LH. Vasopressin: Mechanisms of action on the vasculature in health and in septic shock. *Crit Care Med.* 2007; 35(1):33–40.
33. O'Neill R1, Morales J, Jule M. *J Emerg Med.* 2012 May;42(5):503-10. Early goal-directed therapy (EGDT) for severe sepsis/septic shock: which components of treatment are more difficult to implement in a community-based emergency department? *J Emerg Med.* 2012 May;42(5):503-10.
34. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(12):862-874.
35. Venet F. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J. Immunol.* 2006;177(1):6540–6547.
36. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(3):260-268.
37. Anders HJ. Immune system modulation of kidney regeneration—mechanisms and implications. *Nature Reviews Nephrology.* *Nat Rev Nephrol.* 2014 Jun;10(6):347-58.

38. Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers*. 2011 Suppl 1:S11-21.
39. Wang M, Crisostomo PR, Herring C, Meldrum KK, Meldrum DR. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291(4):R880-4.
40. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Kuro-o M, Moe OW. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int* 2010;78(12):1240-1251.
41. Aiello S, Noris M. Klotho in acute kidney injury: biomarker, therapy, or a bit of both? *Kidney Int*. 2010 Dec;78(12):1208-10.
42. Kuro-o M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol Chem* 2008;389(3):233-241.
43. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, Oguro R, Hanasaki H, Kida I, Takemura Y, Ohishi M, Katsuya T, Rakugi H. Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation. *Endocrine* 2009;35(3):341-346.
44. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):137.
45. Singleton KD, Wischmeyer PE. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor- α and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res*. 2003;35(1):486.
46. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*. 2009;4(1):31-36.

47. London NR, Zhu W, Bozza FA, Smith MCP, Greif DM, Sorensen LK, et al. Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci Transl Med.* 2010;2(1):23-29.
48. Alfieri A, Watson JJ, Kammerer RA, Tasab M, Proglas P, Reeves K, et al. Angiopoietin-1 variant reduces LPS induced microvascular dysfunction in a murine model of sepsis. *Crit Care.* 2012.
49. Daubeuf, B. et al. TLR4/MD-2 monoclonal antibody therapy affords protection in experimental models of septic shock. *J. Immunol.* 2007;179(1):6107–6114.
50. Liliensiek, B. et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J. Clin. Invest.* 2004;113(1):1641–1650.
51. Al-Abed, Y. et al. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J. Biol. Chem.* 2005;280(1):36541–36544.
52. Qin, S. Wang H, Yuan R, Li H, Ochani M, Ochani K, Rosas-Ballina M, Czura CJ, Huston JM, Miller E, Lin X, Sherry B, Kumar A, Larosa G, Newman W, Tracey KJ, Yang H. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J. Exp. Med.* 2006;203(1):1637–1642.
53. Li J, Zhang Y, Lou J, Zhu J, He M, Deng X, Cai Z. Neutralisation of peritoneal IL-17A markedly improves the prognosis of severe septic mice by decreasing neutrophil infiltration and proinflammatory cytokines. *PLoS One.* 2012;7(10):e46506.
54. Zhang Z. Recombinant human activated protein C for the treatment of severe sepsis and septic shock: a study protocol for incorporating observational evidence using a Bayesian approach. *BMJ Open.* 2014 Jul 31;4(7):e005622.
55. Kaneider NC, Leger AJ, Agarwal A, Nguyen N, Perides G, Derian C, Covic L, Kuliopulos A. 'Role reversal' for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nature Immunol.* 2007;8(1):1303–1312.

56. Ward PA. Role of C5 activation products in sepsis. *ScientificWorldJournal*. 2010;10:2395-402.
57. Wang, H. Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, Ulloa L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nature Med*. 2004;10(1):1216–1221.
58. Schmitz D, Wilsenack K, Lendemanns S, Schedlowski M, Oberbeck R. beta-Adrenergic blockade during systemic inflammation: impact on cellular immune functions and survival in a murine model of sepsis. *Resuscitation*. 2007;72(2):286-94.
59. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion*. 2014;54(5):1418-1437.
60. Xu J, Woods CR, Mora AL. Prevention of endotoxin induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:131.
61. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Kitagawa Y, Tilles AW, Tompkins RG, Yarmush ML. Bone marrow mesenchymal stromal cells attenuate organ injury induced by LPS and burn. *Cell Transplant*. 2010;19(6):823-830.
62. Wilmut I, West MD, Lanza RP, Gearhart JD, Smith A, Colman A, et al. Human embryonic stem cells. *Science*. 2005;310(5756):1903.
63. Odorico JS, Kaufmann DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dayton*. 2001;19(1):193-204.
64. Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5(12):1571-1584.

65. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(1):393-403.
66. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al.. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(1):315-317.
67. Sung JH, Yang HM, Park JB, Choi GS, Joh JW, Kwon CH, Chun JM, Lee SK, Kim SJ. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transpl Proc.* 2008;40(1):2649-2654.
68. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 2003;107:2134.
69. Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:11002.
70. Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 2003;53:697.
71. Li ZH, Liao W, Cui XL, Zhao Q, Liu M, Chen YH, Liu TS, Liu NL, Wang F, Yi Y, Shao NS. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *Int J Med Sci.* 2011;8:74.
72. Hauger O, Frost EE, van Heeswijk R, Deminière C, Xue R, Delmas Y, Combe C, Moonen CT, Grenier N, Bulte JW. MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy. *Radiology* 2006;238:200.

73. Weil BR, Herrmann JL, Abarbanell AM, Manukyan MC, Poynter JA, Meldrum DR. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells is associated with improved myocardial function during endotoxemia. *Shock* 2011;36:235.
74. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med.* 2009;15(1):42–9.
75. Brooke G, Tong H, Levesque JP, Atkinson K. Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells.* 2008;17(1):929–940.
76. Tondreau T, Meuleman N, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Delforge A, Dejeneffe M, Martiat P, Bron D, Lagneaux L. In vitro study of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase production by mesenchymal stromal cells in response to inflammatory cytokines: The role of their migration in injured tissues. *Cytotherapy* 2009;11:559.
77. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, Hérault O, Bonnet P, Charbord P, Eder V, Domenech J. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells.* 2006;24:2202
78. Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells: A prerequisite for cell therapy. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45:514.
79. Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, Kaps C, Sittinger M. Towards in situ tissue repair: Human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem* 2007;101:135.
80. Von Luttichau I, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, Djafarzadeh R, Huss R, Nelson PJ. Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells. Dev* 2005;14:329.

81. García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramírez M, Castro JG, Arranz MG, Vicente A, Bueren J, García-Olmo D. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(10):1453-68.
82. Mazhari R, Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: Potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4(Suppl 1):S21.
83. Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages. *Blood.* 2011;118:330.
84. Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang JA, Wei L. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135:799.
85. Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, Furlani D, Piechaczek C, Moebius JM, Lützow K, Lendlein A, Stamm C, Li RK, Steinhoff G. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells.* 2007;25:2118.
86. Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, Morrell ED, Seshadri P, Meldrum KK, Meldrum DR. Sex dimorphisms in activated mesenchymal stem cell function. *Shock.* 2006;26:571.
87. Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119:2204.
88. Zisa D, Shabbir A, Suzuki G, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390:834.

89. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:733.
90. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002;30(1):42-8.
91. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol.* 2003. 57:11-20.
92. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006;36(10):2566-73.
93. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105:1815.
94. Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, Sportoletti P, Falzetti F, Tabilio A. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol.* 2008;36:309.
95. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 2010.
96. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004;8(3):301-316.
97. Azandeh S, Orazizadeh M, Hashemitabar M, Khodadadi A, Shayesteh AA, Nejad DB, et al. Mixed enzymatic-explant protocol for isolation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and encapsulation in 3D culture system. *J. Biomedical Science and Engineering.* 2012;5:580-586.

98. Gadalla SM, Savage SA. Telomere biology in hematopoiesis and stem cell transplantation. *Blood Rev* 2011;25(6):261-269.
99. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 2003;21(1):105-10.
100. Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;6:4-8.
101. Jomura S, Uy M, Mitchell K, Dallsen R, Bode CJ, Xu Y. Potential. Treatment of cerebral global ischemia with Oct-4+ umbilical cord matrix cells. *Stem Cells*. 2007;25(1):98-106.
102. Mei SH, Haitsma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS, Liles WC, Stewart DJ. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial *clearance* and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:1047.
103. Chang CL, Leu S, Sung HC, Zhen YY, Cho CL, Chen A, Tsai TH, Chung SY, Chai HT, Sun CK, Yen CH, Yip HK. Impact of apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cells on attenuating organ damage and reducing mortality in Rat sepsis syndrome induced by cecal puncture and ligation. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10:244.
104. Holly MK, Dear JW, Hu X, Schechter AN, Gladwin MT, Hewitt SM, Hewitt SM, Yuen PS, Star RA. Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. *Kidney Int*. 2006;70(3):496-506.
105. Otte A, Bucan V, Reimers K, Hass R. Mesenchymal Stem Cells Maintain Long-Term In Vitro Stemness During Explant Culture. *Tissue engineering: Part C*. 2013;00:1-12.

106. Fuhr J, Kaczmarczyk J, Kruttgen CD: A simple colorimetric method of inulin determination in renal *clearance* studies on metabolically normal subjects and diabetics. *Klin Wochenschr.* 1955;33:729-730,.
107. Yoon JH¹, Roh EY, Shin S, Jung NH, Song EY, Chang JY, Kim BJ, Jeon HW. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly. *Biomed Res Int.* 2013;2013(1):428726.
108. Priya N, Sarcar S, Majumdar AS, SundarRaj S. Explant culture: a simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and lipoaspirate. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014;8(9):706-716.
109. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006 May;24(5):1294-301.
110. Gonzalez-Rey E, Anderson P, Gonzalez MA, et al. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 2009;58:929.
111. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest.* 2009 Oct;119(10):2868-2878.
112. Rodrigues CE, Sanches TR, Volpini RA, Shimizu MH, Kuriki PS, Camara NO, Seguro AC, Andrade L. Effects of continuous erythropoietin receptor activator in sepsis-induced acute kidney injury and multi-organ dysfunction. *PLoS One.* 2012;7(1):e29893.
113. Souza AC, Volpini RA, Shimizu MH, Sanches TR, Camara NO, Semedo P, Rodrigues CE, Seguro AC, Andrade L. Erythropoietin prevents sepsis-related acute kidney injury in rats by inhibiting NF- κ B and upregulating endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302(8):1045-1054.
114. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Nahmias Y, Goldwasser Y, Kitagawa Y, Tilles AW, Tompkins RG, Parekkadan B, Yarmush ML. Reactive

bone marrow stromal cells attenuate systemic inflammation via sTNFR1. *Mol Ther.* 2010;18(10):1857-64.

115. Kusadasi N, Groeneveld AB. A perspective on mesenchymal stromal cell transplantation in the treatment of sepsis. *Shock.* 2013;40(5):352-7.
116. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemmezova K, Kyurkchiev S. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2014;6(5):552-70.
117. Li Y He X, Olauson H, Larsson TE, Lindgren U. FGF23 affects the lineage fate determination of mesenchymal stem cells. *Calcif Tissue Int.* 2013;93(6):556-64.
118. Joshi AR, Chung CS, Song GY, Lomas J, Priester RA, Ayala A. NF-kappaB activation has tissue-specific effects on immune cell apoptosis during polymicrobial sepsis. *Shock.* 2002;18(4):380-6.

8. Anexos

ANEXO 1: APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA DA FMUSP **APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **14/08/2013**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **286/13** intitulado: **“AVALIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO EM LESÃO DE ÓRGÃOS E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA SEPSE”** apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Lúcia da Conceição Andrade

Pesquisador (a) Executante: José Manuel Córdor Capcha

CEP-FMUSP, 14 de Agosto de 2013.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA**

“Avaliação de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano em lesão de órgãos e a
disfunção endotelial na sepse”

2. PESQUISADOR: JOSÉ MANUEL CÓNDOR CAPCHA

CARGO/FUNÇÃO: Biomédico - Pós-graduando em Nefrologia

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de investigação médica em doenças renais - LIM12

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐	RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do Sujeito de Pesquisa

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1. Apresentação

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar de um projeto de pesquisa científica que envolve o tratamento de ratos com sepse da Faculdade de Medicina da USP. O tratamento em pesquisa é a aplicação de células-tronco provenientes de cordão umbilical humano, e a perspectiva é de que haja melhora na condição clínica desses animais.

Sua participação será a doação de um fragmento do cordão umbilical de sua placenta, após o parto, quando isto não for mais útil para seu bebê. Este fragmento será utilizado para o isolamento das células-tronco.

Sua participação será muito importante para o avanço da pesquisa científica brasileira. Abaixo, há algumas informações técnicas referentes ao protocolo. Sinta-se à vontade para ler o projeto em sua íntegra, e consentir na participação apenas se concordar com os propósitos do projeto e se sentir confortável em colaborar.

2. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

Até o momento, poucas são as terapias disponíveis para evitar os danos secundários feitos pela sepse, tanto em humanos quanto em animais. São muitos os casos de sepse que se apresentam nas salas de operações sendo um grave problema de saúde pública no Brasil. A proposta do presente estudo é verificar se a administração de células-tronco, retiradas de cordão umbilical humano, em ratos com sepse, pode trazer benefícios no sentido de minimizar os danos secundários.

3. Procedimentos que serão utilizados e propósitos:

O procedimento realizado será a retirada de parte do cordão umbilical proveniente de bebês e mães saudáveis, após o parto e a inutilização da placenta e do cordão umbilical.

A placenta e o cordão umbilical não são mais necessários para o bebê após o seu nascimento. Caso a placenta precise ir para análise após o parto, a coleta de amostra do cordão umbilical não atrapalha essa análise. Os exames do bebê que precisam ser coletados do cordão umbilical também não serão prejudicados, sendo coletados antes da coleta para o experimento.

Após a coleta do cordão, as células-tronco serão isoladas e injetadas em ratos com sepse induzida, como tratamento. Não haverá manipulação de seres humanos, apenas do sangue que seria desprezado. Não haverá nenhum procedimento experimental no bebê ou na mãe.

4. Desconfortos e riscos esperados:

Nenhum

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do Sujeito de Pesquisa

5. Benefícios que poderão ser obtidos:

A mãe ou o bebê não terão benefícios diretos por colaborarem com o estudo.

O possível benefício encontrado poderá acontecer aos ratos com sepse da Faculdade de Medicina da USP, pois caso o tratamento seja efetivo, se apresentarão dados importantes para poder transferir o tratamento para o campo clínico.

As células retiradas não serão utilizadas nos bebês doadores, pois as células-tronco ainda são um tratamento em pesquisa, sem riscos e benefícios totalmente definidos. Também não serão usadas no futuro por esses doadores, pois até que as células- tronco se tornem um tratamento seguro e efetivo, essas células já estarão velhas e trazendo riscos a quem venha a utilizá-las.

As células serão isoladas para serem utilizadas em sua totalidade de forma experimental em animais, sendo que eventuais sobras de células serão desprezadas ao final do estudo.

6. Procedimentos alternativos existentes:

Os únicos tratamentos disponíveis para a sepse são algumas medicações que ajudam pouco na redução do efeito inflamatório e a proteção de órgãos-alvo. Estes estudos podem contribuir para o aumento da expectativa de vida dos pacientes com sepse. Mesmo assim, o tratamento não é ainda o ideal, e faz-se necessário o estudo de outras terapias que possam contribuir para a melhora desta doença.

Assim, o estudo da utilização de células-tronco como terapia na sepse poderá contribuir com os avanços da terapia celular.

7. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecimento de eventuais dúvidas:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Prof. Dra Lúcia da Conceição Andrade, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César - CEP: 01246903 - São Paulo - SP - Brasil Telefone(s) +55 11 3061-7281 e-mail: luciacan@usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 2º andar– tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004– E-mail: cep.fm@usp.br

8. Liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e, portanto, deixar de participar do estudo:

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade:

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do Sujeito de Pesquisa

10. Formas de ressarcimento, ao sujeito de pesquisa, decorrentes da participação na pesquisa (gastos com transporte, etc.):

Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, por isso não haverá compensação financeira relacionada à sua participação.

Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11. Disponibilidade de assistência, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa:

Como não haverá nenhum procedimento experimental no bebê ou na mãe, provavelmente não haverá danos à saúde decorrentes da pesquisa. Entretanto, caso haja alguma situação em que isto aconteça, a assistência será disponibilizada prontamente, financiada pelo orçamento da pesquisa. Da mesma forma que na situação acima, caso haja algum dano à saúde dos participantes, estes serão indenizados com verba do orçamento da pesquisa (agência financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP)

12. Se for detectado no sujeito que está sendo selecionado, algum problema de saúde previamente ao início da pesquisa:

Ele será encaminhado ao Sistema Único de Saúde (SUS) para tratamento. Da mesma forma, se houver intercorrência de saúde, com o sujeito participante, decorrente da pesquisa, este será atendido no HU/USP segundo o critério de assistência do mesmo (hospital de atendimento secundário). Se houver necessidade de atendimento de maior complexidade, o sujeito será encaminhado ao SUS pela equipe de pesquisa.

13. Compromisso do Pesquisador:

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo *“Avaliação de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano em lesão de órgãos e a disfunção endotelial na sepse”*

Eu discuti com o Dra. Lúcia da Conceição Andrade, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

São Paulo, ____ / ____ / ____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

São Paulo, ____ / ____ / ____

Lúcia da Conceição Andrade

Médica e pesquisadora do laboratório de
Investigação Médica em Doenças Renais (LIM 12
– Faculdade de Medicina da USP)

ANEXO 3: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de células-tronco mesenquimais em lesão de órgãos e disfunção endotelial na sepse

Pesquisador: Lúcia da Conceição Andrade

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 18323513.2.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 378.603

Data da Relatoria: 30/08/2013

Apresentação do Projeto:

A sepse é uma doença sistêmica se demonstra que o país possui uma alta incidência e que está projetada a seguir crescendo à medida que a população envelhece. Em pesquisas realizadas com ratos no modelo de sepse, a administração de células tronco-mesenquimais (CTM) promoveu a diminuição do efeito sistêmico da doença, protegendo alguns órgãos-alvo

Objetivo da Pesquisa:

O projeto trata de utilização de células tronco mesenquimais (CTM) de cordão umbilical de humano em lesão de órgãos e a disfunção endotelial induzida na sepse sendo neste projeto será estudado com enfoque em três objetivos específicos: Avaliar se a terapia inter-espécies com células tronco é capaz de proteger os

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455

Bairro: PACAEMBU

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 01.248-903

Telefone: (11)3061-8004

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 378.603

rins e os órgãos à distância (principalmente pulmões, coração e microcirculação) contra a agressão sistêmica gerada pela sepse. Avaliar se há diferença de mortalidade entre os animais. Avaliar o efeito imunológico entre a infusão de CTM de cordão umbilical humano, após a agressão na sepse

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos serão mínimos pois o cordão será coletado depois do nascimento. Como benefícios será a aplicação terapêutica clínica de células-tronco mesenquimais na sepse, como possível minimizador da alta mortalidade desta doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é bastante importante e representa um grande avanço na obtenção de suporte para pacientes que apresentam sepsis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3061-8004

E-mail: cep.fm@usp.br

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa: Avaliação de células-tronco mesenquimais em lesão de órgãos e disfunção endotelial na sepse

Informações Preliminares**Responsável Principal**

CPF: 11137982896	Nome: Lúcia da Conceição Andrade
Telefone: (11) 3061-7281	E-mail: luciaca@usp.br

Instituição Proponente

CNPJ: 63.025.530/0018-52	Nome da Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
--------------------------	---

É um estudo internacional? Não

Equipe de Pesquisa

CPF	Nome
29804529807	Camila Eleuterio Rodrigues
	José Manuel Córdor Capcha

Área de Estudo**Área Temática Especial**

Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 2. Ciências Biológicas
- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Ciências Básicas

Título Público da Pesquisa: Avaliação de células-tronco mesenquimais em lesão de órgãos e disfunção endotelial na sepse

Contato Público

CPF	Nome	Telefone	E-mail
11137982896	Lúcia da Conceição Andrade	(11) 3061-7281	luciaca@usp.br

Contato Lúcia da Conceição Andrade

ANEXO 4: CARTA DE ACEITAÇÃO PARA O “ASN KIDNEY WEEK 2014 ANNUAL MEETING” – PHILADELPHIA, ESTADOS UNIDOS

August 8, 2014

Dear Dr. Jose Manuel Condor Capcha

On behalf of the American Society of Nephrology (ASN), thank you for submitting an abstract for the ASN Kidney Week 2014 Annual Meeting, November 13-16 in Philadelphia, PA. We are pleased to inform you that your abstract #2090 “**Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Attenuate Kidney Injury and Endothelial Dysfunction in Sepsis**” has been selected by ASN’s Program Committee for poster presentation. The details of the poster session are outlined below:

Poster Session

Session Title:	AKI: Basic Repair
Session Date, Time:	Thursday, November 13, 2014, 10:00 a.m. - 12:00 p.m.
Your Poster Board #:	TH-PO189

Your poster board number will correspond with the number printed in the ASN Program Builder and Abstract Supplement. Your poster board area will be approximately 4 feet high (1.219m vertical) by 8 feet wide (2.438m horizontal). Please reference the poster instructions to prepare your poster. Exhibit Hall access for poster presenters during the poster set-up/dismantling times will be located at the Exhibit Hall A door. Please plan to set up your materials on your assigned board on Thursday, November 13, 2014 between 7:30 a.m. – 9:15 a.m. Posters should be on display all day while the exhibit hall is open (9:30 a.m. – 2:30 p.m.). **ASN cannot be responsible for posters that are not removed by the specified poster dismantling times. Please [click here](#) for additional poster instructions.**

One of the abstract co-authors must remain at the poster throughout the designated “Poster Presentation” period, which is 10:00 a.m. – 12:00 noon. Many members have noted, and the Program Committee agrees, that the quality of the poster session is reduced when authors are not available to discuss their work.

Poster Printing Service

ASN is pleased to provide a convenient, high quality poster printing service to all poster presenters. This innovative and easy-to-use service allows you to quickly create a poster or upload your own poster. Your poster will be professionally printed and proofed, and best of all, your poster will be waiting for you when you arrive at the meeting in Philadelphia. Prices start as low as \$99. You will receive a separate email with instructions for accessing this program in September.

Posters On-Demand

All posters must be included in Kidney Week Posters On-Demand. This resource allows you to maximize the reach of your poster and fully paid participants to access electronic versions of the posters during and after the meeting. ASN will email upload instructions to the lead authors in September. Lead authors who do not provide their posters for Posters On-Demand may not be eligible for poster presentation next year.

Program and Abstracts Online

The Kidney Week program is available on the [ASN website](#). Abstracts Online will be available on the ASN website by October 23, 2014. The abstracts will remain online for approximately one year. *(Please note that individual posters will not be listed in the Onsite Program.)*

Registration and Housing

Presenting authors of abstracts accepted for oral or poster presentations must register for the Annual Meeting (fees apply) and make their own [housing reservations](#) and travel arrangements. Please note that [early registration](#) closes on September 23, 2014.

Congratulations on having your abstract selected for poster presentation. We appreciate your willingness to participate and look forward to seeing you in Philadelphia. Please direct any questions to ASN at education@asn-online.org.

Sincerely,

Sharon M. Moe, MD, FASN
President

Susan E. Quaggin, MD
Program Committee Chair