Rita de Cássia Cavaglieri

**Terapia com células-tronco na
nefropatia crônica experimental:
é possível bloquear a progressão da doença renal?**

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Irene de Lourdes Noronha

São Paulo
2009

Rita de Cássia Cavaglieri

**Terapia com células-tronco na
nefropatia crônica experimental:
é possível bloquear a progressão da doença renal?**

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Irene de Lourdes Noronha

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cavaglieri, Rita de Cássia

Terapia com células-tronco na nefropatia crônica experimental : é possível bloquear a progressão da doença renal? / Rita de Cássia Cavaglieri. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Irene de Lourdes Noronha.

Descritores: 1.Insuficiência renal crônica 2.Nefrectomia 3.Medula óssea 4.Células-tronco 5.Histologia 6.Imununoistoquímica 7.Ratos

USP/FM/SBD-447/09

DEDICATÓRIA

Ao meu Deus todo poderoso, o criador do céu e da terra, por me sustentar a trilhar neste caminho muitas vezes árduo. Foi Ele quem me carregou em seus braços nos momentos mais difíceis me dando força e muito abrigo. Em forma de gratidão, devolvo este trabalho como a prova do meu amor e fidelidade aos seus propósitos para minha vida. Agradeço também por ter colocado em meu caminho pais tão maravilhosos e que me ensinaram a ter temor e respeito a sua palavra. Meu coração regozija pela oportunidade que me foi prestada.

Amo o Senhor acima de todas as coisas, não posso viver longe do seu amor e nem longe do seu afago. Abraça-me com seus braços de amor, pois sou totalmente dependente de ti.

**Assim diz o Senhor
“Não temas, porque eu sou contigo;
não te assombres, porque eu sou teu Deus;
eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça.”**

Isaías 41:10

AGRADECIMENTOS

Aos meus Tios-Pais, Gildinha e Itamar, primeiramente por me acolheram, me aceitarem como sua filha, me proporcionando assim muito amor e carinho. Agradeço a Deus constantemente, por ter escolhido vocês como meus pais, pois ele sabia o quanto vocês zelariam pelo meu crescimento pessoal, profissional, mas principalmente pelo espiritual. Muito obrigada por acreditarem no meu potencial e também por abrirem mão muitas vezes do seu querer para tornar possível o meu querer. Vocês são a maior prova de que pais são aqueles que criam e educam, não somente os que colocam no mundo. VOCÊS SÃO TUDO NA MINHA VIDA, AMO VOCÊS.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Irene Noronha, exemplo de seriedade e dedicação à pesquisa e também na área clínica. Admiro seu estímulo permanente ao aprimoramento dos que a cercam, na forma de participações a congressos e estágios. Outro aspecto relevante é o seu instinto pioneiro e a inquietação científica, sempre visando a melhora da condição de vida dos pacientes em geral. Sou grata por me permitir fazer parte do seu grupo e por me conceder um projeto tão maravilhoso como este. Levarei comigo seus conselhos e farei o possível para aplicá-los no decorrer da minha jornada profissional. Admiro muito a senhora. Muito obrigada!

Ao meu querido professor e amigo Dr. Miguel Luis Graciano (Miguelito). Assim como um pai educa o seu filho na sua infância, foi o Miguel comigo na minha vida profissional. Sou o que sou profissionalmente, porque você soube plantar bons frutos. Agradeço a Deus todos os dias por ter tocado em seu coração ao me escolher como sua aluna. Bem, nem preciso dizer como você é especial para a minha vida, pois basta conversar com todo mundo para saber quem é o ex-aluno da Dr^a Irene que mais é citado por mim. Fico contente em saber que o aprendizado foi mútuo.

Ao meu amigo Wagner (Careca), não tenho palavras para expressar meu sentimento por você, suas qualidades são infinitas, isto não quer dizer que não tenha defeito, viu? Homem inteligente, de extrema confiança e amigo. Foi meu braço direito, esquerdo, pernas, foi tudo para mim, sem você, não sei como seria. Wa, você é o careca mais querido do Brasil!!!!

Às minhas amigas Cleonice e Andréia, pelo amor, carinho, respeito e companheirismo. Vocês são presentes que Deus colocou na minha vida. Deia, continue esta pessoa divertida, determinada e esforçada, que você vencerá em tudo. E Cleozinha, mente brilhante do laboratório, mas também exemplo de como deve ser uma excelente mãe. Continue lutando sempre pelos seus objetivos e tenho certeza que os alcançará. *Chicas, muchas gracias por todo. You are wonderful!*

Ao Dr. Hugo Ludovico, mais do que um amigo, um irmão. Amizade conquistada e construída a base de muito respeito, confiança e carinho. Hugo meu querido, você sabe que sempre estarei, onde quer que seja pronta para te ouvir, te ajudar, dar conselhos e até chorar contigo. Saiba que você é uma pessoa muito especial. Ahhh, também agradeço pelos paparicos, chocolates e bolos.

À Fernanda Cobucci, minha aluna de iniciação científica, pela incrível ajuda na execução deste projeto. Pela sua dedicação inigualável, determinação e convívio agradável. Louvo muito a Deus por ter me proporcionado uma aluna maravilhosa como você. Espero ter acrescentado muito na sua vida, assim como você me acrescentou.

Ao Dr. Becker, Dimitri e Humberto, meninos inteligentes e esforçados. Obrigada por tudo! Becker, você sabe que mora e sempre morará no meu coração. Você não faz idéia do quanto faz falta no laboratório e o quanto eu sinto saudades das nossas discussões bíblicas nos finais de tarde.

Aos amigos recém conquistados Drs. Rodrigo, Adriana, Carina e Pércia. Pelo apoio, respeito, confiança, carinho e amizade, mas principalmente por compartilharem sempre comigo meus momentos de D.J., risadas e estresses. Espero que eu tenha contribuído no desenvolvimento de vocês na ciência básica, assim como vocês contribuíram para o meu. Ah, já ia me esquecendo, meninas não fiquem tristes, pois a Ícone estará sempre por perto para ajudá-las. Portanto, não se desesperem ☺. Adoro vocês!!!

Aos alunos atuais de iniciação científica: Rosana, William, Alexandre e Filipe. Muito obrigada por tudo. Por sempre se disporem a me auxiliarem nas mínimas coisas que fizeram grandes diferenças. *Sí, pero que no???*

Às ex-alunas Carla, Laila, Tatiana M. e Virginia, que também participaram da fase inicial deste projeto. Muito obrigada pelo carinho e dedicação. Realmente espero ter acrescentado coisas boas na vida de vocês.

Aos meus amigos e colegas adquiridos no laboratório da Dr^a Irene, pessoas maravilhosas que passaram pela minha vida neste período de 9 anos. Ivone e Sabrina, simplesmente me ensinaram tantas coisas que não tenho como relacionar aqui. Elas, assim como o Miguel, me acolheram e me deram muitos conselhos, principalmente de como ser uma profissional. Agradeço também à Camile, Tatiana, Arianni, Camilla Fanelli e Camila Fazzani, por terem sido amigas, companheiras e sempre dispostas a me ajudar. Quantas saudades de vocês. Beth, Therezinha, Flavia, Angela, Augusto, Dr. Francisco Lello e Dr. Roberto Pecoits. Estas foram as primeiras pessoas com quem trabalhei no laboratório da Dr^a Irene. Eles, assim como o Miguel, participaram dos primeiros passos do meu aprendizado.

À Daniele (Daninha), que é a minha grande amiga, apesar de ser séria, é meiga, simples e amorosa. Adoro a sua companhia e seus conselhos. Simplesmente somos o oposto, acho que por isso que nós sempre nos completamos, desde o tempo da faculdade. Não importa o quão distante estejamos, saiba que você sempre estará comigo e eu sempre com você, pois nossa amizade foi selada no céu. Simplesmente te adoro!!!

Ao meu amigo Dr. Denis Feliars, simplesmente não tenho palavras para descrever o quanto foi importante na execução desse projeto. Amigo presente e companheiro em todos os momentos, mesmo morando tão longe. Homem inteligente, esperto, de extrema competência e ética profissional. Deus nos aproximou, pois sabia o quanto você acrescentaria em minha vida. Realmente espero um dia ter a oportunidade de fazer um projeto com você, pois tenho certeza que aprenderei muito e que renderá bons frutos. *Amis pour la vie.*

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

Aos colegas de trabalho do LIM-29, Ana Paula, Ane, Andressa, Fernanda, Eliene, Zenaide, John, Michelle e Bruno, muito obrigada pelo agradável convívio e também pela troca de conhecimentos. Desejo muito sucesso tanto profissional como pessoal.

À Dr^a Vanda Jorgetti, por ser essa pessoa tão maravilhosa. Mulher diferenciada, guerreira e determinada. Tenho orgulho de ter tido a senhora presente e sempre por perto, para me dar conselhos, por também puxar minha orelha, mas principalmente pelo carinho. À Rozi, minha querida Rozi, muito obrigada por dispor seu tempo para vir cortar as minhas laminas no micrótomo. Obrigada também pelo carinho que você tem por mim. Também agradeço a Fabiana, Kátia, Rosa, Daniella, Meire, Rita (loira), Bia, Rodrigo pela ajuda constante e pelo carinho.

À minha amiga Luciene, ela não faz idéia do quanto foi importante durante a minha iniciação científica após o Dr. Miguel concluir seu doutorado. Ela me acolheu e teve muita paciência para me ensinar sobre princípios básicos de cultura celular. Mulher de fibra, inteligentíssima, que não sossega enquanto não encontra uma resposta final para o problema. Lú, eu te admiro muito!!!

Ao Dr. Joel Heimann, obrigada pela paciência nos momentos em que eu solicitava uma ajuda e também pelos ensinamentos sempre detalhados, mostrando timentim por timentim. Agradeço muito pelo carinho que o senhor sente por mim, e não adianta negar, porque eu vejo nos seus olhos. Agradeço também a Luzia, Karen,

Débora, Edson, Nauilo, Sandrinha, Guiliana e Michella, que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Ao Prof. Dr. Roberto Zatz, oops, já tinha me esquecido do nosso contrato. Muito obrigada por me acolher e ajudar sempre que precisei. Agradeço também a Clarice, Bianca, Claudia e Simone. Mas em particular agradeço a Luciana (pessoa) que realizou os cortes e as colorações histológicas de todas as lâminas do mestrado. Seu capricho e dedicação foram de extrema preciosidade. Muito obrigada, Luciana, sinto muita saudade de você e das nossas conversas matinais.

Às meninas da secretaria, Neide e Denise, sempre atenciosas e prestativas em tudo. Não medem esforços para nos ajudar com as burocracias.

Ao Walter e a Janice, que cuidaram da minha principal obra prima, meus ratinhos. Janice, obrigada pela alegria e por sempre estar pronta a ajudar. A você, Walter, muito obrigada pela paciência, pelas ajudas e pelos puxões de orelha. A sua conduta e sua ética profissional realmente são de ter orgulho.

Ao meu chefe, Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowsky, homem escolhido por Deus para ser o meu chefe. Muito obrigada, mais uma vez, pela sua total compreensão em relação às minhas escapadas do seu laboratório para eu poder concluir essa etapa da minha vida. Obrigada por sempre me apoiar e também por confiar em mim. Desde o primeiro dia, soube me respeitar e dar valor aos meus estudos e as oportunidades que aparecem na minha vida. Dr. Sergio, que Deus o abençoe muito e muito mais.

À Dra. Adriana (Debes), pela atenção, carinho e respeito. Mulher guerreira e que admiro muito. Espero que possamos trabalhar por muito e muito mais tempo, pois sei que tenho muito o quê aprender com você.

Ao Felipe e Dr. Sergio Duarte por me confiarem seus trabalhos de doutorado e assim poder ajudar a executá-los. Aprendi muito com vocês nesses últimos 2 anos. Espero realmente que, assim como vocês acrescentaram muito ao meu conhecimento com as células tronco, vocês também possam ter aprendido comigo.

À Vivi, Carolzinha, Denise e Andreia, pela companhia, amizade, palavras amigas e pelos almoços agradáveis. Em particular, agradeço á Carola, pela enorme ajuda prestada nos momentos mais corridos da minha dissertação. Saiba que simplesmente você fez um bom trabalho e que seu esforço, dedicação e determinação, superaram qualquer contaminação (☺).

Ao Jorge por ter me acolhido em Barcelona, não poupou os pés e foi visitar todos os lugares comigo. Muito obrigada pelo carinho e respeito que você tem por mim.

Aos funcionários da Fundação Pró-Sangue Cleide, Débora, Luciana, Linah, Maghanelli, Naná, Rosangela, Nathalia e Joel, muito obrigada por tudo, mas principalmente pela paciência comigo, pois entrar em um laboratório e começar do zero não é fácil.

À Dr^a Walcy, pelas diversas vezes que parou de fazer o que estava fazendo para me dar atenção. Sua experiência profissional associada a sua carisma, simplesmente fazem da senhora uma pessoal incrível.

À Dr^a Mirtez, Patricia e Lúcia, por terem me acolhido no laboratório de hematologia e não medirem esforços para me ensinar tudo o que sei sobre citometria de fluxo. Simplesmente vocês são maravilhosas. Não fiquem tristes, pois vocês ainda terão que me agüentar muito.

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

À FAPESP, pelo aceite e o apoio financeiro como aluna de iniciação científica e de mestrado.

EPÍGRAFE

Impossível

é uma palavra muito grande
que gente pequena usa
para tentar te oprimir

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. CÉLULAS TRONCO (CT)	2
I.1.1. Definição de CT	2
I.1.2. Classificação das CT	3
I.1.3. Células tronco embrionárias (CTe)	3
I.1.4. Células tronco adultas (CTa)	4
I.1.5. Plasticidade celular	6
I.1.6. Nicho de CT no tecido renal	6
I.2. TERAPIA COM CÉLULAS TRONCO	7
I.2.1. Contribuição de CT no reparo renal	8
I.2.1.a) <i>Regeneração glomerular</i>	8
I.2.1.b) <i>Regeneração tubular</i>	9
I.2.1.c) <i>Regeneração da fibrose intersticial</i>	11
I.3. VIA de INOCULAÇÃO da CT	11
I.4. CT em MODELO de DRC	12
I.5. MODELO de ABLAÇÃO RENAL 5/6	14
II. OBJETIVOS	15
III. MATERIAIS E MÉTODOS	16
III.1. ISOLAMENTO de CT	16
III.1.1. Isolamento de CT derivadas de MO (CTdmo)	17
III.1.2. Isolamento de células tronco mesenquimais (CTm)	17
III.1.2.a) <i>Ensaio de crescimento celular em unidade formadora de colônia fibroblastóide</i>	18
III.1.2.b) <i>Método de tripsinização</i>	19
III.1.2.c) <i>Cultivo e expansão das CTm</i>	19
III.1.2.d) <i>Diferenciação in vitro das CTm em células osteogênicas</i>	20

III.2. CARACTERIZAÇÃO das CT por CITOMETRIA de FLUXO	21
III.3. MARCAÇÃO das CT com DAPI	22
III.4. ESTUDO <i>in vivo</i>	23
III.4.1. Modelo de nefrectomia 5/6 em ratos Wistar	23
III.4.2. Inoculação das CT na região subcapsular renal	24
<i>III.4.2.a) Análise da localização e migração das CT</i>	24
<i>III.4.2.b) Protocolo I- CTdmo em ratos Wistar fêmeas</i>	25
<i>III.4.2.c) Protocolo II- CTm em ratos Wistar machos</i>	25
III.4.3. Protocolos e grupos experimentais	25
<i>III.4.3.a) Protocolo I – CTdmo inoculadas em ratos Wistar fêmeas</i>	25
<i>III.4.3.b) Protocolo II – CTm inoculadas em ratos Wistar machos</i>	26
<i>III.4.3.c) Esquematização dos protocolos I e II</i>	26
III.4.4. Pressão arterial caudal	27
III.4.5. Excreção urinária de proteína e albumina	27
III.4.6. Creatinina sérica	29
III.4.7. Avaliação histológica	29
<i>III.4.7.a) Preparo do tecido renal</i>	29
<i>III.4.7.b) Processo de parafinização e desparafinização das do tecido renal</i>	30
<i>III.4.7.c) Coloração de Ácido Periódico de Schiff para análise de glomeruloesclerose</i>	31
<i>III.4.7.d) Coloração de Tricômio de Masson para análise de fibrose intersticial</i>	31
III.4.8. Análise histológica	32
<i>III.4.8.a) Análise histológica da via de inoculação subcapsular renal</i>	32
<i>III.4.8.b) Análise histológica da glomeruloesclerose e fibrose Intersticial</i>	32
III.4.9. Imunohistoquímica	33
<i>III.4.9.a) Desparafinização para reações de imunohistoquímica</i>	34
<i>III.4.9.b) Técnica de exposição de epítomos para imunohistoquímica</i>	34
<i>III.4.9.c) Identificação de podócitos por WT-1</i>	35
<i>III.4.9.d) Identificação de macrófagos, linfócitos T e de miofibroblastos (Técnica da avidina-biotina/fosfatase alcalina)</i>	36
<i>III.4.9.e) Identificação de células em proliferação (Técnica da avidina-biotina/eroxidade)</i>	37

III.4.10. Análise da imunohistoquímica	38
III.4.10.a) <i>Análise da CTdmo inoculada na subcapsula renal</i>	39
III.4.10.b) <i>Cálculo para quantificação de macrófagos e linfócitos</i>	39
III.4.10.c) <i>Cálculo para quantificação de miofibroblastos</i>	39
III.4.10.d) <i>Cálculo para quantificação de células em proliferação</i>	40
III.4.10.e) <i>Cálculo para quantificação de podócitos</i>	40
III.4.11. Análise estatística	40

IV. RESULTADOS..... 41

IV.1. ISOLAMENTO das CTdmo.....	41
IV.2. CARACTERIZAÇÃO CELULAR das CTdmo	42
IV.3. ISOLAMENTO e CULTIVO CELULAR das CTm.....	43
IV.3.1. Identificação de formação de colônias celulares	45
IV.3.2. Diferenciação celular de CTm em linhagem osteogênica	46
IV.3.3. Caracterização celular das CTm.....	47
IV.4. INOCULAÇÃO de CT na REGIÃO SUBCAPSULAR RENAL	48
IV.4.1. Análise da infiltração de CT no tecido renal	48
IV.5. PROTOCOLO I – CTdmo em RATOS WISTAR FÊMEAS.....	52
IV.5.1. Pressão arterial caudal	53
IV.5.2. Proteinúria	54
IV.5.3. Albuminúria	55
IV.5.4. Dosagem de creatinina sérica	56
IV.5.5. Análise dos marcadores inflamatórios e da atividade proliferativa	57
IV.5.5.a) <i>Macrófagos</i>	57
IV.5.5.b) <i>Linfócitos</i>	59
IV.5.5.c) <i>PCNA</i>	61
IV.6. PROTOCOLO II – CTm em RATOS WISTAR MACHOS	63
IV.6.1. Pressão arterial caudal	64
IV.6.2. Proteinúria	65
IV.6.3. Albuminúria	66
IV.6.4. Dosagem de creatinina sérica	67
IV.6.5. Glomeruloesclerose	68
IV.6.6. Fibrose Intersticial.....	70
IV.6.7. Análise por imunohistoquímica.....	72
IV.6.7.a) <i>WT-1</i>	73
IV.6.7.b) <i>Macrófagos</i>	75
IV.6.7.c) <i>Linfócitos</i>	77
IV.6.7.d) <i>Miofibroblastos</i>	79
IV.6.7.e) <i>Análise da atividade proliferativa</i>	81

V. DISCUSSÃO.....83

V. CONCLUSÕES	96
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus centígrados
μ	Micro
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa
CD	<i>Cluster determinant</i>
cél/mm ²	Células por milímetro quadrado
cm ²	Centímetro quadrado
CT	Célula-tronco
CTa	Célula-tronco adultas
CTdmo	Célula-tronco derivada de medula óssea
CTe	Célula-tronco embrionária
CTh	Célula-tronco hematopoiética
CTM	Células-tronco mesenquimais
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	<i>4'6-diamidino-2-phenylindole</i>
dL	Decilitro
DMEM	Meio de <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
DRC	Doença renal crônica
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Grama
Hg	Mercúrio
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IDR	Imunodifusão radial
kg	Kilograma
L	Litro
m	Mili
M	Molar
mg	Miligrama
mm	Milímetro
MO	Medula óssea
NTA	Necrose tubular aguda
Nx	Nefrectomia 5/6
PBS	Solução salina fosfato-tamponada
PCNA	Células em atividade proliferativa
PE	Ficoeritina
PE-Cy 5.5	Ficoeritina-Cy 5.5
pH	Potencial hidrogênico
RPM	Rotações por minuto

SFB	Soro fetal bovino
TBS	Solução salina tris-tamponada
UV	Ultravioleta
<i>vs</i>	<i>Versus</i>
WT-1	<i>Wilm's tumor 1</i>
α	Alfa
β	Beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Contagem das células após o isolamento por gradiente de concentração.....	41
Figura 2.	Caracterização da população celular de CTdmo a ser inoculada nos ratos Wistar	42
Figura 3.	Padronização da técnica de obtenção das CTm	44
Figura 4.	Crescimento celular em colônias com formato fibroblástico.....	45
Figura 5.	Diferenciação das CTm em células da linhagem osteogênica	46
Figura 6.	Caracterização celular de marcadores de superfície por citometria de fluxo.	47
Figura 7.	Inoculação de CT sob a cápsula renal.	48
Figura 8.	Corte histológico de rim de rato 5 dias após a inoculação de CTdmo	49
Figura 9.	Análise semi-quantitativa da distribuição das CTdmo inoculadas em ratos machos depois de 5, 10, 15 e 30 dias	50
Figura 10.	Distribuição e localização da CTdmo no tecido renal.....	51
Figura 11.	Pressão arterial caudal dos animais nos diferentes grupos.....	53
Figura 12.	Proteína urinária dos animais nos diferentes grupos	54
Figura 13.	Albumina urinária dos animais nos diferentes grupos	55
Figura 14.	Creatinina sérica dos animais nos diferentes grupos.....	56
Figura 15.	Infiltração de macrófagos em rim após 15 dias de inoculação	57
Figura 16.	Expressão de macrófagos em rins de ratos após 5, 10, 15 e 30 dias da inoculação subcapsular renal de CTdmo.....	58
Figura 17.	Infiltração de linfócitos em rim após 15 dias de inoculação	59
Figura 18.	Expressão de linfócitos em rins de ratos após 5, 10, 15 e 30 dias da inoculação subcapsular renal de CTdmo.....	60
Figura 19.	Células em proliferação em rim após 15 dias de inoculação	61
Figura 20.	Expressão de PCNA em rim de rato após 5, 10, 15 e 30 dias da inoculação subcapsular de renal CTdmo.....	62
Figura 21.	Pressão arterial caudal dos animais nos diferentes grupos.....	64
Figura 22.	Proteinúria dos animais nos diferentes grupos	65
Figura 23.	Albuminúria dos animais nos diferentes grupos	66

Figura 24. Creatinina sérica dos animais nos diferentes grupos.....	67
Figura 25. Índice de glomeruloesclerose nos diferentes grupos.....	68
Figura 26. Avaliação histológica de glomeruloesclerose	69
Figura 27. Índice de fibrose intersticial nos diferentes grupos.....	70
Figura 28. Avaliação histológica de fibrose intersticial.....	71
Figura 29. Expressão de WT-1 em glomérulos nos diferentes grupos	73
Figura 30. Expressão de WT-1 (podócitos) em glomérulos, identificada por imunohistoquímica, nos grupos Sham, Nx, Nx+CTm, no período de 30 dias	74
Figura 31. Resultados do número de macrófagos no interstício renal nos diferentes grupos, tanto em 15 dias como em 30 dias.....	75
Figura 32. Macrófagos identificados por imunohistoquímica na região do interstício renal nos grupos Sham, Nx, Nx+CTm, no período de 30 dias.....	76
Figura 33. Resultados do número de linfócitos T nos diferentes grupos tanto em 15 dias como em 30 dias	77
Figura 34. Linfócitos T no interstício renal nos grupos Sham, Nx e Nx+CTm no período de 30 dias	78
Figura 35. Resultados da expressão de α -actina no tecido renal dos diferentes grupos, refletindo o número de miofibroblastos neste compartimento	79
Figura 36. Expressão de α -actina identificada por imunohistoquímica na região do interstício renal nos grupos Sham, Nx, Nx+CTm no período de 30 dias	80
Figura 37. Resultados da atividade proliferativa nas diferentes regiões do tecido renal nos diferentes grupos	81
Figura 38. Expressão de PCNA identificada por imunohistoquímica nas regiões glomerulares, tubulares e intersticiais nos grupos Sham, Nx, Nx+CTm no período de 30 dias	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Anticorpos utilizados para caracterização das células da medula óssea	21
Tabela 2.	Anticorpos utilizados na imunohistoquímica.....	33
Tabela 3.	Resultados da pressão caudal, proteinúria, albuminúria e creatinina dos animais que receberam CTdmo	52
Tabela 4.	Resultados do peso, pressão caudal, albuminúria, creatinina e histologia nos diferentes grupos de animais do protocolo experimental com CTm.....	63
Tabela 5.	Resultados da imunohistoquímica nos diferentes grupos de animais do protocolo experimental com CTm	72

RESUMO

Cavaglieri, RC. Terapia com células-tronco na nefropatia crônica experimental: é possível bloquear a progressão da doença renal? [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2009.

Células-tronco (CT) apresentam potencial terapêutico para a doença renal pela possibilidade de regeneração tecidual e recuperação funcional, possivelmente por efeitos parácrinos. Diversos trabalhos mostraram seu efeito renoprotetor em modelo de insuficiência renal aguda. No entanto, existem poucos trabalhos que avaliaram o efeito da CT em doença renal crônica. Neste contexto, a via de inoculação e o número das CT na região da lesão podem desempenhar um papel crucial. Assim, o transplante de CT pela via EV não parece ser o mais apropriado para prover CT em número expressivo no órgão alvo. Uma técnica alternativa consiste em inocular as CT localmente, na região subcapsular renal. O objetivo do presente estudo foi analisar, em modelo experimental de doença renal crônica por nefrectomia 5/6 (Nx), a migração, a distribuição e o possível efeito renoprotetor da inoculação via subcapsular renal de 2 tipos de CT: derivadas da medula óssea (CTdmo) e mesenquimais (CTm). As CT foram coletadas de fêmur e tíbia de ratos doadores através da técnica de *flushing*. As CTdmo foram isoladas por gradiente de concentração e as CTm pela sua capacidade de aderência ao plástico e ambas marcadas com DAPI para a visualização no tecido. A caracterização das CT foi feita por citometria de fluxo e pela diferenciação celular *in vitro*. Foram realizados 2 protocolos experimentais. No protocolo I, CTdmo (1×10^6) foram inoculadas em ratos fêmeas e, no protocolo II, CTm (2×10^5) foram inoculadas em ratos machos. A região inoculada foi a subcapsula renal e os animais foram acompanhados por 15 e 30 dias. Os animais foram subdivididos nos grupos: **Sham**, ratos submetidos à cirurgia fictícia; **Sham+CT**, ratos submetidos à cirurgia fictícia que receberam CT (CTdmo ou CTm); **Nx**, ratos submetidos a nefrectomia 5/6; **Nx+CT**, Nx ratos que receberam CT (CTdmo ou CTm). Para avaliar a localização das CTdmo no tecido renal, utilizou-se a coloração de tricrômio de Masson e foi realizada uma análise semi-quantitativa para avaliar o grau de infiltração. Foram analisadas a pressão arterial (PA), a albuminúria e a creatinina sérica. Para os animais que receberam CTm foi realizada a análise de parâmetros histológicos e a análise de marcadores inflamatórios, de células em atividade proliferativa, de miofibroblastos e de podócitos. Os resultados do **Protocolo I** avaliando a análise da infiltração no tecido renal das CTdmo marcadas com DAPI mostrou, em 5 dias, evidente infiltração das células da região subcapsular em sentido ao córtex e medula, inclusive presente em glomérulos. Ratos fêmeas Nx que receberam a inoculação das CTdmo na região da subcapsular renal não apresentaram melhora nos parâmetros que avaliaram a função renal. **Protocolo II:** as CTm cultivadas mostraram grande capacidade de aderência, crescimento em colônia e de diferenciação em células osteogênicas. A análise por

citometria mostrou-se positiva para CD44 e CD90, com uma pequena população de células de CD34, CD45 e CD31, confirmando a presença preponderante de CTm. A inoculação de CTm em ratos Nx proporcionou um bloqueio da progressão da doença renal. Enquanto ratos Nx machos apresentaram elevada PA com 15 e 30 dias ($149,6 \pm 9,1$ e $191,7 \pm 2,8$ mmHg) a inoculação de CTm promoveu significativa redução após 30 dias ($145,2 \pm 6,8$ mmHg; $p < 0,05$ vs Nx). Em ratos Nx foi observado um aumento na creatinina aos 15 e 30 dias ($1,13 \pm 0,08$ e $1,16 \pm 0,26$ mg/dL) e a inoculação de CTm promoveu uma marcante redução aos 15 dias ($0,58 \pm 0,03$ mg/dL; $p < 0,05$ vs Nx). A albuminúria foi elevada nos ratos Nx aos 15 e 30 dias ($41,7 \pm 10,8$ mg/24h e $138,7 \pm 33,6$ mg/24h) enquanto os animais do grupo Nx+CTm aos 15 e 30 dias apresentaram diminuição significativa ($4,6 \pm 1,5$ mg/24h e $23,4 \pm 7,7$ mg/24h; $p < 0,0001$ vs Nx). A glomeruloesclerose do grupo Nx+CTm apresentou aos 30 dias uma redução significativa em relação ao grupo Nx ($5,4 \pm 2,5\%$ vs $22,0 \pm 6,1\%$, respectivamente; $p < 0,0001$). A análise da fibrose intersticial não revelou diferença após 15 dias e 30 dias no grupo Nx+CTm em relação ao grupo Nx. Com relação ao número de macrófagos, linfócitos e de células em atividade proliferativa, os animais que receberam CTm apresentaram uma discreta diminuição de sua expressão no tecido renal. A expressão de α -actina se reduziu significativamente no grupo Nx+CTm. Quanto à expressão de WT-1, específico para podócitos, os animais Nx+CTm tiveram aumento significativo da marcação em relação ao grupo Nx. Em resumo, após a inoculação de CT na região da subcapsula renal, houve marcante migração e distribuição das mesmas em direção à cortical e à medular. A inoculação de CTm proporcionou um efeito renoprotetor no modelo de nefrectomia 5/6. Sendo assim, a inoculação subcapsular renal pode representar uma importante via de inoculação, permitindo assim que um número maior de células atue na proteção da progressão da doença.

Descritores: 1.Insuficiência renal crônica 2.Nefrectomia 3.Medula óssea 4.Células-tronco 5.Histologia 6.Imunohistoquímica 7.Ratos

SUMMARY

Cavaglieri, R.C. Stem cell therapy in experimental chronic nephropathy: is it possible to block the progression of renal disease? [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008.

Stem cells (SCs) offer therapeutic potential for the treatment of renal diseases, due to the possibility of tissue regeneration and functional recovery. Various studies have shown renoprotection by SCs in experimental models of acute kidney disease. However, only a few studies have studied their effect in chronic kidney disease. The beneficial effect of SCs seems related to their capacity to differentiate or to secrete paracrine/endocrine factors. In this context, the inoculation route or the number of SCs homing in the injured region can play a crucial role. Therefore, transplantation of MSC through the intravenous route does not seem to be best suited for delivery of an important number of cells to the target organ. An alternative technique consists in local delivery of SCs in the subcapsular region of the kidney. The objective of the present study is to analyze the migration, distribution and potential renoprotective effect of the subcapsular inoculation of two types of SC - *BSMC* and mesenchymal stem cell (MSC) - in an experimental model of chronic kidney disease, the 5/6 nephrectomy (Nx). SCs were collected from the femur and tibia of donor rats by flushing. *BSMC* were isolated by centrifugation on a concentration gradient and MSCs were isolated by their capacity to adhere to plastic. Both types of SC were stained with DAPI to allow visualization in tissues. SC characterization was carried out by flow cytometry and differentiation in culture. Two experimental procedures were performed. In **protocol I**, *BSMC* (10^6 cells) were injected in female rats and in **protocol II**, MSCs (2×10^5 cells) were injected in male rats. Animals were divided into 4 groups: **SHAM**, sham-operated rats; **SHAM+SC**, sham-operated rats receiving *BSMC* or MSCs; **Nx**, rats undergoing 5/6 nephrectomy; **Nx+SC**, 5/6 Nx rats receiving *BSMC* or MSCs. We used Masson's Trichrome staining and a semi-quantitative analysis according to the degree of infiltration to follow the localization of *BSMC* in the renal tissue and to quantify their infiltration, respectively. The following parameters were studied: arterial blood pressure (AP), proteinuria (U_{prot}), albuminuria (U_{alb}) and serum creatinine (S_{creat}). For the animals receiving SCs, analysis of histology, of inflammatory markers, of proliferating cells and of podocytes was performed. Results from **Protocol I** assessing DAPI-stained *BSMC* showed marked infiltration in 5 days from the subcapsular region to the cortex and the medulla, including presence in the glomeruli, over a period of 15 days. Female rats that received subcapsular injection of *BSMC* did not show improvement of the parameters used to assess kidney function. **Protocol II**: cultured MSCs demonstrated an ability to adhere to plastic, to grow in colonies and to differentiate in osteogenic cells. Quantitative analysis of cell markers by flow cytometry showed that isolated cells were positive for CD44 and CD90, with a small population of cells positive for CD31, CD34 and CD45, confirming a preponderant presence of MSCs. Inoculation

of MSCs in Nx rats blocked the progression of the renal disease. Elevated AP in Nx rats at 15 and 30 days (149.6 ± 9.1 and 191.7 ± 2.8 mm Hg, respectively) was significantly reduced by inoculation of MSCs at 30 days (145.2 ± 6.8 mm Hg, $p < 0.05$ vs Nx). Nx rats showed increased creatinine at 15 and 30 days (1.13 ± 0.08 and 1.16 ± 0.26 mg/dL, respectively) that was significantly reduced by injection of MSCs at 15 days (0.58 ± 0.03 mg/dL, $p < 0.05$ vs Nx). Albuminuria was increased in Nx rats at 15 and 30 days (41.7 ± 10.8 and 138.7 ± 33.6 mg/24h, respectively) and was reduced in the Nx+MSC group at both time points (4.6 ± 1.5 , and 23.4 ± 7.7 mg/24h, respectively; $p < 0.0001$ vs Nx). Histologic analysis showed that glomerulosclerosis at 30 days in the Nx+MSC group was significantly reduced as compared to the Nx group (5.4 ± 2.5 % vs 22.0 ± 6.1 %, $p < 0.0001$). Analysis of interstitial fibrosis did not show difference after 15 and 30 days in the Nx+MSC group compared to Nx group. Nx rats receiving MSCs showed slightly decreased inflammation markers, macrophages and lymphocytes, and proliferating cells in the renal tissue when compared to Nx rats. Analysis of myofibroblasts showed a significant decrease in expression of α -smooth muscle actin in Nx+MSC rats compared to Nx rats. Podocyte number was analyzed by detection of WT-1, a specific marker. Nx rats receiving MSC had a significantly higher number of podocytes than Nx rats. In conclusion, our results show that after inoculation in the subcapsular region, SCs migrate throughout the cortex in direction of the medulla. Subcapsular inoculation of MSC provides a renoprotective effect in the model of 5/6 nephrectomy. Therefore, subcapsular inoculation could represent an important route of delivery of SCs to the kidney that allows a higher number of cells to act in the protection from progression of the disease.

Tags: 1.Chronic renal failure 2.Nephrectomy 3.Bone marrow 4.Stem cells
5.Histology 6.Immunohistochemistry 7.Rat

I. INTRODUÇÃO

Grande parte das nefropatias crônicas progressivas está diretamente relacionada a doenças comuns na população mundial, tais como hipertensão arterial e diabetes mellitus, e este fato caracteriza a doença renal crônica como um problema sério de saúde pública. De acordo com os dados do Censo Brasileiro de Nefrologia, o Brasil mantém atualmente cerca de 87.044 pacientes em diálise, o que corresponde a uma prevalência de 468 pacientes por milhão de habitantes (www.jbn.org.br). Embora a diálise seja ainda a terapia substitutiva predominante para os pacientes renais crônicos, o transplante renal tem conquistado notável importância. No Brasil, no ano de 2007 foram realizados 3.397 transplantes renais (www.abto.org.br). Estes números revelam a tendência de aumento significativo do número de procedimentos de alta complexidade nesta área, que já é o de mais alto custo para o Ministério da Saúde. Assim, ressalta-se a importância de investimento em pesquisa básica e pré-clínica nesta área, não apenas pela indiscutível relevância, mas também em termos de política econômica de saúde.

Um dos maiores desafios da Nefrologia é conseguir interromper o processo de progressão da doença renal ou, pelo menos, prolongar ao máximo o tempo de evolução para a perda funcional total dos rins. Isto não significa apenas prorrogar o tempo de entrada em diálise, mas também evitar a morbidade da doença renal crônica (DRC) e suas consequências.

As manobras terapêuticas empregadas na tentativa de impedir a progressão da doença renal parecem não ser completamente eficazes, além da limitação de certos

fármacos em atuar em mecanismos específicos, levando os pacientes portadores de DRC a serem submetidos a terapias substitutivas (diálise e transplante renal).

Nos últimos anos, acompanhando os avanços da terapia celular regenerativa em diversas áreas da medicina, o potencial uso de células-tronco como uma alternativa terapêutica em doenças renais passou também a ser investigado (Ito et al., 2001; Rookmaaker et al., 2003; Uchimura et al., 2005; Kunter et al., 2006 e 2007).

I.1. CÉLULAS-TRONCO (CT)

Nos últimos anos, testemunhamos uma explosão de interesse no uso das CT como ferramenta para terapia celular e gênica. Tal interesse tem sido impulsionado pelas inúmeras descobertas em relação a estas células, em especial a de que são capazes de proliferar e se diferenciar em células de diversas linhagens (Baksh et al., 2004).

I.1.1. Definição de CT

As CT são células primordiais indiferenciadas, encontradas em tecidos embrionários e também em tecidos adultos, responsáveis pela formação do embrião e pela manutenção dos tecidos na vida adulta, respectivamente (Ricardo et al., 2005; Anglani et al., 2004).

Conceitualmente, as CT apresentam três características fundamentais: 1) auto-replicação ilimitada, ou seja, capacidade de multiplicar-se gerando cópias idênticas à célula original durante toda a vida; 2) capacidade de se diferenciar em diferentes linhagens celulares; 3) capacidade de reconstituir funcionalmente, *in vivo*, um tecido lesado (Verfaillie et al., 2002; Okamoto & Campos, 2004).

I.1.2. Classificação das CT

De acordo com sua capacidade de diferenciação, as CT são geralmente classificadas em: 1) células totipotentes, consideradas as células mestras do corpo, pois carregam a informação necessária para dar origem a todos os tecidos que formam o corpo humano, inclusive a placenta e anexos embrionários; 2) células pluripotentes, que têm a habilidade de originar as células dos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma), ou seja, qualquer célula do organismo, mas são incapazes de gerar um novo indivíduo; 3) células multipotentes, que originam quatro ou mais linhagens celulares; 4) células unipotentes, que conseguem diferenciar-se em um único tecido (Young et al., 2004; Schena et al., 2003).

I.1.3. Células-tronco embrionárias (CTe)

O termo CTe é designado às células encontradas cerca de cinco dias após a fertilização, conhecida como blastocisto, uma esfera com aproximadamente 100 células, com uma massa de células interna.

Três características tornam estas células mais atrativas que as CT adultas: a) podem crescer indefinidamente em cultura; b) podem ser geneticamente manipuladas mais facilmente, o que permite a correção da perda de genes funcionais; c) podem gerar quase todos os tipos celulares (Choi et al., 2005).

CTe isoladas em cultura e marcadas por deleções ou inserções de genes foram introduzidas em embriões de camundongos e geraram animais que carregavam os transgenes em todos os tecidos (Al-Awqati & Oliver, 2002).

Apesar do uso potencial de CTe para o tratamento de várias doenças, questões éticas a cerca de sua obtenção e utilização ainda persistem (Guan et al., 1999; Odorico et al., 2001; Rippon et al., 2008).

I.1.4. Células-tronco adultas (CTa)

A medula óssea (MO) é um tecido derivado do mesoderma, suportado por um microambiente de células do estroma encaixadas na matriz extracelular, e formado por um componente celular hematopoiético complexo além ser de fonte de células-tronco adulta (CTa) (Gurkan et al., 2008).

Ferrari et al. em 1998, apresentaram o primeiro trabalho sobre CTa, demonstrando que CT derivadas de medula óssea (CTdmo) podem migrar para as áreas de lesão no músculo e dar origem a células musculares. Posteriormente, outro grupo demonstrou que essas CTa não são apenas multipotentes, capazes de gerar tipos celulares que compõem o tecido ou órgão específico onde estão situadas, mas também são pluripotentes, pois podem gerar células de outros órgãos e tecidos (Bjornson et al., 1999).

Outra característica da CTa é a sua capacidade de migrar de diferentes locais para o local da lesão, possibilitando assim uma grande flexibilidade para o local do enxerto destas células.

As CTa são divididas em CT hematopoiéticas (CTh) e CT estromais ou mesenquimais (CTm). Até o momento, as CTh foram encontradas na MO, no sangue periférico e no sangue de cordão umbilical, onde correspondem aproximadamente a 0,1-1% do total de células. As CTh apresentam proteínas de superfície de membrana que lhes conferem características fenotípicas específicas: CD34, CD117, CD 133 e

Sca-1. Essas células não apresentam as proteínas CD44, CD73, CD90 e CD105 (Herrera et al., 2006). Estes marcadores são utilizados em diversos trabalhos com o objetivo de detectar e purificar as CTh.

Outro tipo de CT presente na MO, as CTm fornecem suporte à hematopoiese e também geram células de linhagem mesodérmica, como osteoblastos, condrócitos e adipócitos. Diferente das CTh, as CTm são negativas para CD34 e CD117 e expressam na superfície da membrana as proteínas CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105. Quando em um microambiente específico, essas células são capazes de se diferenciar e em uma gama variável de células, como as do coração, dos ossos, de cartilagem, do tecido conjuntivo e do tecido nervoso, podendo até mesmo regenerar os tecidos (Minguell et al., 2001; Meirelles et al., 2003).

Evidências de que as CTm que circulam no sangue periférico têm surgido nos últimos anos. Em 1997 Fernandez e colaboradores foram os primeiros a reportarem a presença de células “estromais”, pertencentes a um tecido conectivo não funcional de sustentação, no sangue periférico (Fernandez et al., 1997). Alguns anos depois, dois outros grupos demonstraram que as CTm circulam no sangue periférico do adulto, mas que são extremamente raras (Zvaifler et al., 2000; Kuznetsov et al., 2001).

Outra fonte de CTa é o sangue do cordão, as CTa derivadas do sangue do cordão umbilical representam uma fonte para reconstituição hematopoiética, já que uma quantidade relativamente grande de CTh pode ser coletada da veia do cordão umbilical (Dovat et al., 1997). Além das CTh, o sangue do cordão umbilical também contém células progenitoras identificadas pela expressão dos marcadores celulares

específicos CD31 (célula endotelial) e CD106 (molécula de adesão endotelial) (Canque et al., 2000).

I.1.5. Plasticidade celular

Diversos estudos sugerem que as CT podem ter a habilidade de atravessar as barreiras das linhagens celulares e adotar um perfil de expressão gênica, função e fenótipo de células de outros tecidos (Herzog et al., 2003, Verfaillie et al., 2005), fenômeno conhecido como plasticidade. Exemplos desta propriedade das CT foram apresentados em diversos estudos, nos quais CT diferenciaram em hepatócitos (Austin et. al., 2003), células tubulares renais (Kale et al., 2003) e em ilhotas pancreáticas em cultura (Ianus et al., 2003).

I.1.6. Nicho de CT no tecido renal

Nos últimos anos, alguns estudos têm identificado a presença de um nicho de CT em tecido renal. Em 2004 Oliver e colaboradores, assumindo que estas células apresentam ciclo celular lento, administraram nucleosídeo bromodeoxiuridina (BrdU) em filhotes de ratos para localizar posteriormente as células incorporadas com BrdU. As células incorporadas com BrdU foram localizadas na papila renal. Além disso, estes autores observaram que após estes animais serem submetidos à isquemia-reperfusão, as células localizadas na região papilar migraram em direção à região isquêmica, sugerindo que o nicho de CT renal situa-se na região da papila renal (Oliver et al., 2004). Outros autores observaram a presença de CT em sítios peri-tubulares e na região S3 do túbulo proximal, sendo esta região possivelmente outra fonte de CT residentes (Abbate et al., 1999).

I.2. TERAPIA com CT

Devido ao seu fácil isolamento, cultivo, manipulação, potencial de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas, as CT vêm sendo estudadas com a perspectiva de atuarem diretamente em regiões lesadas e promoverem o reparo tecidual, estratégia denominada medicina regenerativa (Kassem et al., 2004; Blanc et al., 2005).

Tradicionalmente, acreditava-se que as CT se diferenciavam em uma linhagem restrita e de um órgão específico. Estudos recentes sugerem, por exemplo, a participação de CTdmo na regeneração de tecidos não hematopoiéticos. Foi demonstrado que as CTdmo, quando inoculadas em diferentes órgãos como coração (Orlic et al., 2001), pulmão (Theise et al., 2000), cérebro (Eglitis et al., 1997), músculo esquelético (Ferrari et al., 1998) e endotélio vascular (Krause et al., 2002), diferenciaram-se e passaram a expressar proteínas específicas de cada tecido.

Orlic e colaboradores demonstraram em pacientes com infarto agudo do miocárdio que a administração de citocinas, tais como, fator de células-tronco (SCF) e fator de estimulação de colônia granulocítica (G-CSF), proporcionou a translocação de CTdmo para o coração, resultando assim um significativo reparo tecidual bem como um aumento na função cardíaca (Orlic et al., 2001). Kawamoto e colaboradores demonstraram que CT isoladas de sangue periférico humano, mantidas em cultura e diferenciadas em células progenitoras endoteliais foram capazes de remodelar e melhorar a função cardíaca quando inoculadas em ratos com isquemia do miocárdio (Kawamoto et al., 2001).

I.2.1. Contribuição de CT no reparo renal

Uma vez que as CT têm potencial de regenerar tecidos/órgãos lesados, a perspectiva de utilizá-las em terapias que possam recuperar e/ou melhorar a função renal em doenças renais tem motivado a realização de vários estudos em modelos experimentais de lesão renal. Ainda que os mecanismos de ação destas células não estejam completamente elucidados, de uma maneira geral os estudos têm reportado melhora na função renal (proteinúria, creatinina sérica e taxa de filtração renal) quando CT atingem a região lesada.

Apesar da migração de CT ou de progenitoras de MO para o tecido renal e sua diferenciação e fusão com células locais ter sido descrito, a total extensão e importância destes fatos ainda não está clara (Murry et al., 2004; Nygren et al., 2004). Além de possibilitar o reparo da região lesada, outros possíveis efeitos terapêuticos das CT incluem a produção de citocinas e fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), derivado de célula de estroma-1 (SDF-1), de crescimento de hepatócito (HGF) e de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (Urbich, 2003). A produção local destas citocinas e fatores de crescimento podem contribuir para o desenvolvimento de um microambiente propício à regeneração.

I.2.1.a) Regeneração Glomerular

Ito e colaboradores inocularam CTdmo proteína verde fluorescente (GFP) GFP-positivas de ratos machos em fêmeas irradiadas e 21 dias depois induziram doença glomerular por anti-Thy1.1. Cerca de 11-12% de células no glomérulo regenerado eram GFP-positivas, valor que aumentou até o fim do processo de regeneração (Ito et al., 2001).

A utilização de MO total (Rookmaaker et al., 2003) e células precursoras de endotélio (Uchimura et al., 2005) no mesmo modelo de glomerulonefrite, promoveu regressão da lesão glomerular. Neste mesmo modelo Kunter e colaboradores utilizando CTm, além da regeneração glomerular foi constatada uma marcante melhora na proteinúria e diminuição na creatinina sérica (Kunter et al., 2006 e 2007).

Outro estudo no qual a regeneração mesangial foi analisada, realizado por Masuya e colaboradores, observou que CTh foram capazes de se diferenciar em células mesangiais em camundongos irradiados letalmente, sugerindo um *turnover* de células mesangiais. (Masuya et al., 2003).

1.2.1.b) Regeneração Tubular

Poulsom e colaboradores após inocularem CTdmo de camundongos machos em camundongos fêmeas, detectaram a presença do cromossomo Y nas células tubulares dos rins das fêmeas receptoras. No mesmo trabalho, foram apresentados dados de estudos com pacientes do sexo masculino que receberam transplante de rim de doadoras de sexo feminino, mostrando que 7,9% de células epiteliais corticais no enxerto renal foram positivas para o cromossomo Y. Estes resultados demonstram que CTdmo podem ser uma fonte de regeneração para as células tubulares renais (Poulsom et al., 2001). De forma semelhante, Gupta e colaboradores verificaram a presença de células extra-renais em pacientes submetidos a transplante e que desenvolveram necrose tubular aguda (NTA). Em casos em que o doador era feminino e o receptor masculino, cerca de 1% das células tubulares do enxerto continham o cromossomo Y e expressavam citoqueratina, indicando que células

progenitoras do receptor colonizaram e se diferenciaram no enxerto renal (Gupta et al., 2002).

Camundongos receptores cuja MO foi irradiada e que receberam CTh de doadores transgênicos para o gene lacZ foram submetidos à isquemia/reperfusão, para a indução do modelo de necrose tubular aguda. Nos animais receptores cerca de 20% dos túbulos da medula renal produziam β -galactosidase e, portanto eram de origem do doador (Kale et al., 2003). Estes resultados forneceram evidências definitivas de que *in vivo* as CTdmo podem desempenhar um papel no reparo do tecido renal, sugerindo assim que células progenitoras podem ser recrutadas nas regiões lesadas e se diferenciarem em células epiteliais tubulares renais.

Lin e colaboradores demonstraram em modelo de isquemia/reperfusão renal que CTh inoculadas via endovenosa podem integrar e regenerar a área lesada. Também mostraram que, uma vez integradas à região lesada, as células perderam a expressão de CD45, um marcador comum em leucócitos, evidenciando novamente que CTh podem se diferenciar em células renais durante a regeneração tecidual. Entretanto, neste trabalho os autores não avaliaram se a regeneração observada foi efetiva no reparo da função renal (Lin et al., 2003).

Morigi e colaboradores demonstraram, em modelo de insuficiência renal aguda, que CTm inoculadas via endovenosa migraram, infiltraram a região da lesão e se diferenciaram em células do epitélio tubular, promovendo recuperação morfológica e funcional do rim o restauro da estrutura e função renais (Morigi et al., 2004). Utilizando o mesmo modelo, Semedo e colaboradores também demonstraram que CTm inoculadas via intravenosa reduziram os níveis de creatinina sérica e de uréia plasmática. Além disso, através da análise do aumento da expressão de PCNA,

observaram uma regeneração precoce das células tubulares lesadas (Semedo et al., 2007).

1.2.1.c) Regeneração da Fibrose Intersticial

O papel das CT na regeneração do tecido renal, tanto glomerular quanto tubular, vem sendo investigado. Entretanto, o possível efeito de CT nos mecanismos de fibrogeneses ainda foi muito pouco estudado em modelo de DCR.

Grimm e colaboradores, em trabalho com pacientes portadores de rejeição crônica renal, demonstraram que células progenitoras mesenquimais dos próprios receptores infiltraram as camadas neo-íntima, adventícia e o interstício perivascular do enxerto renal. Estes resultados mostram que as células precursoras circulantes têm o potencial de migrar para áreas de inflamação e os autores sugerem que estas células poderiam atuar no processo de remodelagem do tecido (Grimm et al., 2001).

Trabalhando com camundongos, Ninichuk e colaboradores demonstraram em animais com DRC que CTm inoculadas por via endovenosa migraram para o tecido renal e constataram a diminuição da área intersticial e da expressão de marcadores de fibrose (Ninichuk et al., 2006).

I.3. VIA de INOCULAÇÃO da CT

A maioria dos estudos com CT utiliza vias de inoculação endovenosa ou intra-arterial. Considerando que para as CT desempenharem seu efeito local é necessário que elas migrem para a região da lesão, alternativas de vias de inoculação que proporcionem a permanência, por um período prolongado, de um maior número de células no local da lesão, devem ser discutidas.

Estudos recentes demonstraram que tanto a inoculação via endovenosa quanto a via intra-arterial não foram eficientes vias para oferecer as CT ao órgão-alvo. A administração de CT através da circulação possibilitou que apenas 8% das células inoculadas atingissem e se permanecessem na região da lesão (Kunter et al., 2006; Hauger et al., 2006).

Em estudo comparativo de vias de inoculação Kinomura e colaboradores, observaram que a inoculação subcapsular permite que um número maior de células atinja e permaneça na região da lesão em relação à via intra-arterial (Kinomura et al., 2008).

Neste contexto, propomos a inoculação na região subcapsular renal, pois independente do mecanismo de renoproteção induzido pela inoculação de CT pressupomos que a oferta de um número elevado de CT no local de lesão, facilite a disponibilidade de CT irem à região lesada, o que pode ser importante para que as CT possam exercer funções regenerativas no local da lesão.

I.4. CT em MODELO de DRC

Na DRC ocorrem importantes alterações morfológicas e funcionais que culminam com a falência renal absoluta. A etiologia e a patogênese da DCR ainda não foram totalmente elucidadas. No entanto, diversas causas que levam à DCR são conhecidas, tais como nefroesclerose hipertensiva, nefropatia diabética, glomerulonefrite, doença renal policística, entre outras.

Um dos principais marcadores de cronicidade é a fibrose intersticial, correlacionando-se com o processo de irreversibilidade funcional do néfron. Com o objetivo de bloquear a progressão de DCR e o processo de fibrogênese, várias

alternativas terapêuticas têm sido propostas. Entre estas medidas destacam-se o uso de drogas anti-hipertensivas (particularmente inibidores da enzima de conversão e bloqueadores de receptores de angiotensina II) e imunossuppressores (corticosteróides, ciclosporina, ciclofosfamida, micofenolato mofetil). Estas medidas têm sido fortemente exploradas, com sucesso apenas parcial na redução e no bloqueio da progressão da fibrose (Graciano et al., 2004; Fujihara et al., 2005). Neste contexto, a busca de outras alternativas que possam agir bloqueando a progressão da lesão, como o uso do potencial terapêutico de CT, merecem ser investigada.

Dentre os poucos estudos publicados analisando o possível efeito de CT na DRC experimental, destaca-se o estudo de Li e colaboradores que avaliaram o efeito a longo prazo de CTm em modelo de glomerulonefrite induzida por anti-Thy-1 associado à nefrectomia unilateral. Seus resultados demonstraram que as CT contribuíram no reparo e regeneração de células endoteliais e mesangiais (Li et al., 2006).

Utilizando a mesma estratégia de administração de CTm em modelo anti-Thy-1 mais nefrectomia unilateral, Kunter e colaboradores localizaram CTm em 70% dos glomérulos, indicando uma melhora da lesão e observaram importante redução da proteinúria após inoculação indicando uma melhora da função renal (Kunter et al., 2007). Recentemente, Caldas e colaboradores demonstraram em modelo de ablação 5/6 que a inoculação de CTdmo e CTm na região intra-parenquimatosa induziu uma melhora na taxa de filtração glomerular e uma tendência a diminuir a proteinúria após 60 dias de tratamento (Caldas et al., 2008).

I.5. MODELO de ABLAÇÃO RENAL 5/6

O modelo experimental de ablação 5/6 caracterizado por nefrectomia do rim direito e infarto de dois terços do rim esquerdo, tem sido um dos modelos mais utilizados para estudar a DCR progressiva. Dois aspectos deste modelo merecem especial atenção. O primeiro aspecto é na fase inicial, onde se observa uma profunda alteração dinâmica e o segundo aspecto é na fase tardia, na qual se desenvolve uma síndrome de hipertensão sistêmica e glomerular, proteinúria e glomeruloesclerose progressiva (Anderson et al., 1985; Fujihara et al., 1991). Esta intensa glomeruloesclerose resulta na falência funcional do rim remanescente (Olson et al., 1982; Brenner et al., 1985).

Assim, o modelo de ablação renal 5/6 constitui um importante modelo para o estudo não apenas dos mecanismos patogênicos como também para avaliar a intervenções terapêuticas.

Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de CT em DRC induzida por ablação renal 5/6. Este enfoque visa acompanhar uma possível regeneração funcional e morfológica do tecido através do uso de CTdmo e/ou CTm inoculadas diretamente no tecido renal, mais especificamente na região subcapsular renal.

II. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da inoculação de CT em modelo experimental de doença renal crônica progressiva (modelo ablação renal 5/6) inoculadas na região subcapsular renal.

Mais detalhadamente, os objetivos podem ser descritos como:

- 1) Padronizar o isolamento de CT derivada de medula óssea (CTdmo) e CT mesenquimais (CTm), caracterizar os marcadores de superfície celular por citometria de fluxo e avaliar o potencial de diferenciação celular das CTm em células de linhagem osteogênica;
- 2) Avaliar o efeito da inoculação de CT no modelo de doença renal crônica progressiva, através da análise de parâmetros clínicos e laboratoriais (pressão caudal, albuminúria e dosagem da creatinina sérica);
- 3) Avaliar o efeito da CT na glomeruloesclerose e fibrose intersticial através da análise histológica;
- 4) Analisar o efeito da inoculação de CT no mecanismo celular e inflamatório da doença renal crônica através da avaliação do número de macrófagos, linfócitos e miofibroblastos nos diferentes grupos, além de analisar a atividade proliferativa das células renais, através da marcação com antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e a presença de podócitos por WT-1.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. ISOLAMENTO das CT

As CT foram isoladas da medula óssea (MO) de ossos longos de ratos Wistar, machos, com idade entre 8 e 12 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de USP.

Os ratos doadores foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de cetamina (35,6 mg/Kg) (Ketamin-S, Cristália) e xilazina (5,7 mg/kg) (Rompum, Bayer) e em seguida foi realizada a assepsia das patas traseiras com sabão seguido de álcool iodado. Com o auxílio de um bisturi fez-se uma incisão somente na pele da pata, a fim de localizar o osso femoral esquerdo. Este foi exposto e removido do osso ilíaco com o auxílio de um bisturi e transferido para um tubo plástico contendo solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS) (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 7,1 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM). O mesmo procedimento foi adotado para a pata direita.

Em um fluxo laminar esterilizado com luz UV por 30 minutos, as epífises dos ossos foram cortadas com o auxílio de uma pequena serra e a MO foi retirada por lavagem (*flushing*) com 1 mL de PBS estéril com o auxílio de uma seringa. A medula foi homogeneizada através da passagem sucessiva por agulhas de três calibres, de 19, 21 e 23 G, e em seguida ressuspensa em um volume total de 2mL de PBS estéril.

III.1.1. Isolamento das CT derivadas da MO (CTdmo)

A suspensão de células da MO foi transferida lentamente para um tubo contendo Ficoll-Paque (Armesthan Biosciences, Uppsala, Suécia) (gradiente de densidade), numa proporção 1:1, procedimento adaptado a partir de protocolos já descritos (Xu et al, 2004; Guarita-Souza et al, 2005). O material foi centrifugado a 400g por 30 minutos a 25 °C e freado lentamente para não desfazer o gradiente. A faixa branca onde ficam localizadas as células mononucleares (densidade de 1,063 a 1,077 g/ml) foi aspirada com o auxílio de uma pipeta e transferida para um tubo contendo PBS estéril e centrifugada a 200g por 10 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso com 1 mL de PBS.

Desta suspensão, 10µL foram transferidos para um microtubo de 1 mL que continha 90µL de azul de trypan com azida sódica a 0,01%. O tubo foi homogenizado e 10 µL da diluição foram colocados em cada face de uma câmara do hemocítômetro. Foram contados 16 campos, onde se contavam as células não coradas de azul. A média desses campos foi multiplicada por 10 (diluição com trypan) e por 10⁴ (fator do hemocítômetro). Assim, se obtinha o número de células viáveis para prosseguir o experimento.

III.1.2. Isolamento das CT mesenquimais (CTm)

Para o isolamento das CTm, a suspensão celular com PBS depois de realizado a técnica de “flush” foi centrifugada a 300g por 5 minutos a 25 °C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o botão celular foi vigorosamente agitado para desfazer os grumos e ressuspenso com 1 mL de DMEM *low glucose* (Gibco-Invitrogen, Rockville, EUA) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP,

Brasil). Uma alíquota dessa suspensão foi separada para a realização da contagem celular utilizando o azul de trypan.

Em seguida, essas células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Gibco-Invitrogen, Rockville, EUA) com 10% SFB e antimicrobianos (penicilina 100U/ml e estreptomicina 100 µg/mL) em garrafas de 25 cm² com aproximadamente 15×10^4 cél/mL e em placas de 6 poços com 1×10^3 cél/mL. Estas garrafas e placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 72 horas, para que ocorresse a separação da fração celular aderente das células não aderentes e que estas células não aderentes fossem removidas no momento da troca do meio de cultura. As trocas do meio de cultura foram realizadas a cada 3 dias e as células aderentes foram mantidas em cultura até a obtenção de uma confluência de aproximadamente 80%.

III.1.2.a) Ensaio de crescimento celular em unidade formadora de colônia fibroblastóide

As células cultivadas em placas de 6 poços, após atingirem 60% de confluência (em torno de 10 dias de cultivo), foram coradas com corante de Giensa (Merck, Darmstadt, Alemanha) para verificar se estava ocorrendo a formação de colônias celulares.

O meio de cultura foi removido totalmente e as células foram fixadas com etanol 96% por 2 minutos. Logo após, colocou-se o corante de Giemsa por 3 minutos e em seguida foram lavadas com água destilada e armazenadas a 4 °C em geladeira. As colônias com mais de 100 células puderam ser observadas a olho nu e as colônias com menor quantidade de células foram observadas através do microscópio invertido (Nikon Corp., Tokyo, Japão).

III.1.2.b) Método de tripsinização

Após atingirem 80% de confluência, com crescimento em colônia e com morfologia fibroblastóide, o meio de cultura foi retirado das garrafas e realizada 3 vezes a lavagem com PBS estéril por 5 minutos cada, para retirar por completo o SFB. Logo após, foram colocados 3 mL de tripsina (Gibco-Invitrogen, Rockville, EUA) com 1 mM EDTA a 37°C nas garrafas por 3 minutos. Estas garrafas foram agitadas levemente para o desprendimento total das células e em seguida, para inibir a ação da tripsina, foi utilizado meio de cultura suplementado com SFB. Depois, as células foram transferidas para tubos cônicos (Corning, Corning, NY, EUA) de 15mL e centrifugados (300g por 5 minutos à 4°C). O sobrenadante foi desprezado e o botão celular foi ressuspenso com 1mL de meio de cultura completo. Em seguida foi realizada a contagem de células viáveis utilizando a coloração de azul de trypan e a partir dessa contagem as CTm foram novamente replaqueadas. A tripsinização e o replaqueamento das células é determinada como passagem celular.

III.1.2.c) Cultivo e expansão das CTm

Após a contagem celular, foram cultivadas 15×10^4 cél/mL de CTm em garrafas de 25cm², contendo meio de cultura completo (DMEM-Low Glucose + 10%SFB + antibióticos) e incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. O cultivo celular foi monitorado sob microscopia invertida e o meio de cultivo foi trocado 3 vezes por semana.

As células foram cultivadas por tantas passagens quanto possíveis e descartadas quando perdiam a capacidade de expansão e apresentavam características morfológicas sugestivas de células senescentes.

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

III.1.2.d) Diferenciação in vitro das CTm em células osteogênicas

A diferenciação osteogênica de cultura de CTm de rato Wistar foi executada seguindo o protocolo de Morigi et al (Pittenger et al., 1999)

As células aderentes foram cultivadas em placas de 6 poços numa densidade celular de 3×10^3 cél/mL com meio de cultura completo por 5 dias. Nesta ocasião, todo o meio de cultura completo foi substituído por um meio de cultura completo suplementado com 10 mM de β -glicero-fosfato, 50 μ g/mL de ácido ascórbico e 100 nM de dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), próprio para a diferenciação osteogênica. Para o controle de não-diferenciação em linhagem osteogênica, foram realizados cultivos somente com meio de cultura completo.

A placa foi mantida em estufa úmida à 37°C com 5% de CO₂ e trocado 2 vezes por semana, num período de incubação de 21 dias. Depois de completar o período de incubação, as células foram lavadas com PBS por 5 minutos e, em seguida, adicionou-se a solução para coloração da fosfatase alcalina (N,N Dimetilformamida C₃H₇NO, Naphtol ASMX; Fast Red; Tris 0,05M pH 9,0) por 30 minutos a 37°C. Foram lavadas posteriormente com PBS e fixadas com formaldeído a 4% por 5 minutos. Esta coloração foi utilizada para verificar a atividade da fosfatase alcalina. Para evidenciar a presença de cálcio nas células foi realizada a coloração de Vermelho de alizarina, onde primeiramente as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida lavada em

água corrente e corada por 15 minutos com vermelho de alizarina. Após esse tempo, as placas foram novamente lavadas com água destilada. Todas as placas foram armazenadas a 4°C em geladeira.

III.2. CARACTERIZAÇÃO das CT por CITOMETRIA de FLUXO

A caracterização das populações celulares presentes nas amostras de MO foi determinada pelo método de citometria de fluxo. A identificação dos antígenos foi realizada através de diferentes anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*), ficoeritina (PE, *phycoeritin*) e ficoeritina-Cy 5.5 (PE-Cy 5.5, *phycoeritin-Cy 5.5*). Controles de marcações inespecíficas foram utilizados para a adequada calibração do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra. Todos os anticorpos foram adquiridos da empresa Caltag, Invitrogen, Brasil. Na tabela 1 estão descritos os anticorpos utilizados.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para caracterização das células da medula óssea

Anticorpo	Especificidade	Fluorocromo conjugado	Diluição
CD-31	Endotelial	FITC	1:100
CD-34	CTh	PE	1:100
CD-44	CTm	PE	1:100
CD-45	Pan-leucocitário	PE Cy 5.5	1:100
CD-90	CTm	FITC	1:100

As células obtidas e quantificadas como descrita anteriormente foram ajustadas na concentração de $2,5 \times 10^6$ em 500 μ L. Em seguida, 100 μ L foram transferidos para um tubo específico para citometria (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), previamente identificadas, e incubadas com os anticorpos conjugados aos fluorocromos por um período de 15 minutos em campo escuro à temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de PBS e centrifugado a 300g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi homogeneizado e ressuspensão em 500 μ L de solução de formaldeído (Formaldeído PA / Vetec, Brasil) diluído a 1% em PBS e estocado na geladeira ao abrigo da luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo, sendo este tempo para a análise em, no máximo, 24 horas.

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

III.3. MARCAÇÃO das CT com DAPI

As CT depois de serem isoladas foram incubadas com um marcador nuclear utilizado em imuno-fluorescência, DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) a fim de poder localizar as células transplantadas através da fluorescência. Tanto as CT_{dm} como as CT_m foram incubadas com DAPI numa concentração de 10 μ g/ml a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a tripsinização, a contagem e

preparadas as alíquotas para a inoculação das células nos grupos experimentais. Para realizar a visualização das células marcadas foi utilizado um microscópio de fluorescência (Olympus-BX51, Tóquio, Japão).

III.4. ESTUDO *in vivo*

Foram utilizados 55 ratos Wistar fêmeas com peso inicial de 190 a 220g e 56 ratos Wistar machos com peso inicial de 250 a 300g, mantidos em biotério numa sala com controle de temperatura e umidade do ar. Os animais foram obtidos de uma colônia mantida pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq n° 856/06 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

III.4.1. Modelo de nefrectomia 5/6 em ratos Wistar

Os animais foram anestesiados com a associação de cetamina + xilazina (70mg/Kg). Em seguida, foi realizada tricotomia na região abdominal e assepsia com álcool iodado. A cavidade abdominal foi aberta com a tesoura romba-romba. Em seguida, as vísceras foram afastadas para a dissecação da artéria renal esquerda. Dois ou três ramos da artéria esquerda foram ligados com fio de nylon 9-0. Em seguida, as vísceras foram passadas para o outro lado do abdômen para a realização da nefrectomia direita. A artéria e a veia renal direita foram ligadas com fio de algodão 4-0 e em seguida o rim foi retirado. As vísceras foram recolocadas na cavidade abdominal e hidratadas com 3 ml de solução fisiológica. Para a sutura da musculatura

abdominal foi usado fio cromado 5-0, utilizando ponto separado simples e a sutura da pele foi realizada com fio de algodão 4-0.

Os ratos foram colocados em gaiolas de plástico forradas com maravalha e sob aquecimento com lâmpada incandescente. Os animais foram novamente alojados no biotério até o fim do período protocolo experimental.

III.4.2. Inoculação das CT na região subcapsular renal

Animais receptores foram anestesiados e submetidos à lombotomia esquerda. O rim esquerdo foi acessado e um corte de 5 mm foi realizado na cápsula renal. A inoculação das CT foi realizada com o auxílio de um capilar de plástico estéril colocadas sob a cápsula renal e injetadas com o auxílio de um micro-injetor. O micro-injetor consistiu de uma seringa de vidro de 1mL acoplada a uma escala de 0,001mm. Após a infusão das CT, a cápsula renal foi cauterizada com bisturi elétrico. A incisão da lombotomia do animal foi suturada com fio de seda 5,0.

III.4.2.a) Análise da localização e migração das CT

Inicialmente foi realizado um experimento para padronizar a técnica de inoculação das CT no espaço subcapsular renal, a fim de proporcionar um maior número de células a região lesionada. Foram inoculadas 1×10^6 CTdmo, suspensas em 10 μ L de PBS, em 12 ratos Wistar machos normais, pesando entre 220 a 270g. Os animais foram divididos em grupos por períodos de 5, 10, 15 e 30 dias após a inoculação via subcapsular, estas células foram previamente marcadas com DAPI, marcador nuclear fluorescente e para verificar a presença e a distribuição dessas

células no tecido renal foram utilizadas lâminas coradas pela coloração de Tricrômio de Masson.

*III.4.2.b) **Protocolo I:** CTdmo em Ratos Wistar fêmeas*

Para o protocolo experimental I foram utilizados CTdmo de doadores machos e inoculadas em receptores fêmeas a fim de, em um futuro estudo, localizar no tecido renal a presença das células inoculadas através da presença de cromossomo Y, presente somente em machos. O número de CTdmo inoculada na região subcapsular foi 1×10^6 células em 10 μ L de PBS, sendo este utilizado como veículo das células.

*III.4.2.c) **Protocolo II:** CTm em ratos Wistar machos*

Para o protocolo experimental II foram utilizados CTm de doadores machos e inoculadas em receptores machos. O número de CTm inoculada na região subcapsular foi 2×10^5 células em 10 μ L de PBS.

III.4.3. Protocolos e grupos experimentais

*III.4.3.a) **Protocolo I – CTdmo inoculadas em ratos Wistar **FÊMEAS*****

Foram distribuídos em grupos, da seguinte forma:

Nx:	Ratos Wistar submetidos a nefrectomia 5/6 para a indução da doença renal crônica;
Nx + CTdmo:	Ratos Nx que receberam CTdmo de ratos machos no momento da ablação;
Sham:	Ratos Wistar controle submetidos à cirurgia fictícia Sham, sem doença renal;
Sham + CTdmo:	Ratos Sham, sem doença renal que receberam CTdmo de ratos machos no momento da ablação.

III.4.3.b) Protocolo II – CTm inoculadas em ratos Wistar **MACHOS**

Foram distribuídos em grupos, da seguinte forma:

Nx:	Ratos Wistar submetidos a nefrectomia 5/6 para a indução da doença renal crônica;
Nx + PBS:	Ratos Nx que receberam somente o veículo utilizado para a inoculação;
Nx + CTm:	Ratos Nx que receberam CTm no momento da ablação;
Sham:	Ratos normais submetidos à cirurgia fictícia, sem doença renal;
Sham + PBS:	Ratos Sham, sem doença renal que receberam somente o veículo utilizado para a inoculação;
Sham + CTm:	Ratos Sham, sem doença renal que receberam CTm no momento da cirurgia.

III.4.3.c) Esquematização dos protocolos I e II

A distribuição dos ratos nos grupos está representada na esquematização abaixo:

III.4.4. Pressão arterial caudal

A pressão arterial sistólica foi medida ao final do período de acompanhamento, por três dias consecutivos, sendo que em cada dia a pressão foi registrada de 3 a 5 vezes. A média das pressões verificadas no terceiro dia foi considerada a pressão arterial dos ratos em questão. Para tal medida, os ratos foram colocados em sala apropriada no período da manhã. A pressão caudal foi medida por meio de um equipamento acoplado a um transdutor de pressão (RTBP 2000 - Kent Scientific Corporation, Torrington, Connecticut, USA), o qual fornece um sinal analógico. Este sinal analógico foi digitalizado e registrado utilizando-se um sistema computadorizado de aquisição e análise dos dados utilizando o programa DASyLab 7.0 (DASyTec, National Instruments Company, Amherst, New Hampshire, USA).

As medidas foram realizadas com os animais acordados e foram consideradas apenas aquelas obtidas em condição de ausência de movimentação do animal.

III.4.5. Excreção urinária de proteína e albumina

Na véspera do sacrifício os animais foram deixados por 24 horas em gaiolas metabólicas com coleta de urina e registro do volume urinário. Para a análise de albuminúria foi retirada uma alíquota de 10 ml de urina, que foi centrifugada (2000 rpm, 10 minutos) e armazenada a -20°C até a data do processamento. Em outra amostra de urina foi feita a dosagem de proteinúria pelo método do ácido sulfossalicílico.

A albuminúria de 24 horas foi quantificada através de dosagem por imunodifusão radial (IDR). Para realizar esta técnica utilizaram-se placas de gel de agarose. As placas de gel foram preparadas misturando 3ml de agarose a 2% (a 55°C)

com 3ml de uma solução de anticorpo anti-albumina de rato (Cappel, Aurora, OH, EUA) 1:30 em Tampão Tris-Barbital 0,06M pH 8,8 (a 55°C). A solução foi homogeneizada a 55°C e 1,25ml desta solução foi colocada em uma placa de IDR para 6 poços, posta em uma base plana. A agarose foi então solidificada a 4°C, por aproximadamente 4 horas em câmara úmida.

Cada poço foi perfurado e preenchido com 7,5µL de amostras de urina (pura ou previamente diluída em soro fisiológico), sendo que 3 poços foram preenchidos com padrões de albumina de rato a 2,5mg%, 10mg% e 20mg%. A placa foi coberta com tampa de acrílico e colocada por 24 horas em câmara úmida em geladeira a 4°C.

O halo formado em torno do poço foi medido com régua apropriada, que fornece o quadrado do diâmetro do mesmo em leitura direta. Foi construída uma curva padrão relacionando-se o quadrado do diâmetro observado com a concentração do padrão correspondente, através de regressão linear. A leitura do quadrado do diâmetro obtido para cada amostra foi plotada na curva padrão, obtendo-se a concentração da amostra em mg% de albumina de rato.

Para a dosagem preliminar da proteinúria foi construída uma curva padrão envolvendo 4 pares de tubos com diluições crescentes de albumina bovina (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA): 0; 0,5mg/mL; 1,0mg/mL e 2,0mg/mL. Cada tubo recebeu inicialmente 4,5 ml de ácido sulfossalicílico a 1% (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) e então 0,5 ml do padrão. Adicionalmente foi preparado um tubo com 4,5 de ácido sulfossalicílico e 0,5 ml de urina para cada rato examinado. Os tubos foram agitados gentilmente para homogeneizar as amostras e a leitura da absorbância em 530nm foi realizada em um espectrofotômetro (Hitach U-2000, Japão). A concentração de proteína nas amostras de urina foi inferida a partir dos valores de

absorbância plotados na curva padrão. A excreção urinária de proteínas em 24 horas foi obtida multiplicando-se a concentração de proteína medida pelo volume urinário observado.

III.4.6. Creatinina sérica

A dosagem da creatinina sérica das amostras de sangue colhidas foi feita através de um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, Brasil) baseado na reação de Jaffé-picrato alcalino. Resumidamente, a creatinina do soro reage com a solução de picrato em meio alcalino, formando a 37°C um complexo de cor amarelada que é medido fotometricamente a 510 nm. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina verdadeira, em mg/dL.

III.4.7. Avaliação histológica

III.4.7.a) Preparo do tecido renal

No fim de cada período, os animais foram anestesiados com a associação de cetamina + xilazina (70mg/Kg) intraperitoneal para a realização da retirada do rim esquerdo. Então o rim foi seccionado em fragmentos coronais de aproximadamente 5mm e 2 destes fragmentos foram colocados numa solução de Duboscq-Brazil durante 40 minutos e em seguida transferido para uma solução de formol a 4% em tampão fosfato salino e incluído em blocos de parafina. Para a realização de tecido congelado foi colocado o material sobre o meio de inclusão *Jung Tissue Freezing Medium* (Leica Products, Alemanha), e realizado o congelamento em nitrogênio

líquido e em seguida armazenado a -80°C . Foi utilizado o criostato (Reichert-Jung CM3000, Leica Products, Alemanha) para realizar cortes de $5\mu\text{m}$ de espessura. Após os cortes, as lâminas foram secadas ao ar e fixadas nem acetona (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 7 minutos. Seguido da fixação, as lâminas permaneceram em temperatura ambiente e em seguida foram armazenadas a -80°C até a ocasião do uso para a visualização no microscópio de fluorescência.

III.4.7.b) Processo de parafinização e desparafinização do tecido renal

Os fragmentos de rim de aproximadamente 5 mm foram previamente lavados em solução fisiológica e permaneceram 45 minutos em solução de Duboscq-Brazil. Em seguida, os fragmentos foram identificados e colocados em caixetas perfuradas e mantidos em solução de formol 4% em tampão fosfato salina até a inclusão em blocos de parafina.

O processo de parafinização foi realizado pelo processador automático de tecido “histokinette” (Jung-Histokinette 2000 Leica, Alemanha) e durou cerca de 14 horas. O processo foi iniciado pela desidratação dos tecidos em álcoois com concentrações progressivas (álcool 50%, álcool 70%, álcool 96% (2 banhos), álcool absoluto (2 banhos), seguida da diafanização, passando os tecidos em uma solução de álcool absoluto + xilol (v/v) e em três banhos de xilol, sendo então imersos em parafina fundida a 60°C . O material parafinizado foi incluído em blocos/moldes e permaneceu em temperatura ambiente.

Os blocos de parafina permaneceram 30 minutos a -20°C e, em seguida, foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) com navalhas descartáveis. Os fragmentos, com espessura de 3 a $4\mu\text{m}$, foram aderidos em lâminas previamente revestidas por gelatina 2% (Sigma Chemical

CO, St. Louis, EUA). As lâminas com os cortes permaneceram em estufa (Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil) a 60°C por 2 horas e em seguida foram armazenadas a 4°C.

Para a realização das colorações histológicas, as lâminas passaram por um processo de desparafinização, ou seja, permaneceram 9 minutos em xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 2 vezes. Em seguida, as lâminas foram desidratadas, através de banho em etanol absoluto (2 vezes) (Merck, Darmstadt, Alemanha), etanol 96% e etanol 70%. Para finalizar este processo, as lâminas foram imersas em água destilada e processadas para as colorações histológicas.

III.4.7.c) Coloração de Ácido Periódico de Schiff para análise de glomeruloesclerose

Após terem passado pelo processo de desparafinização, as lâminas foram lavadas em água destilada e permaneceram em ácido periódico 1% durante 10 minutos, sendo lavadas em seguida em água destilada. As lâminas foram coradas pelo reativo de Schiff durante 45 minutos, em ambiente escuro, e lavado em água corrente durante 10 minutos. A contra-coloração foi realizada com a hematoxilina de Harris por 5 minutos, lavadas em água corrente e montadas com lamínulas com o meio permanente Permunt (Fisher Chemical, Pittsburgh, EUA).

III.4.7.d) Coloração de Tricômio de Masson para análise de fibrose intersticial

Após desparafinização, as lâminas foram imersas em uma solução de hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Em seguida, foram lavadas rapidamente em água corrente, permanecendo no escarlate de Briebrich (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) durante 5 minutos e novamente lavadas em água corrente. Em seguida, as lâminas foram submersas em diferenciador de Masson durante 5 minutos,

seguindo-se para uma solução de anilina a 5%. As lâminas foram então lavadas em água corrente. O próximo procedimento foi a lavagem das lâminas em água acética a 1%, para a fixação da anilina. Em seguida, as lâminas passaram pelo processo de desidratação e diafanização e foram montadas com meio permanente Permount (Merck, Darmstadt, Alemanha).

III.4.8. Análise histológica

III.4.8.a) Análise histológica da via de inoculação subcapsular renal

Para avaliar a presença e infiltração das CTdmo, no córtex e na medula, utilizou-se o aumento de 100x para analisar o fragmento renal. Foi realizada uma análise semi-quantitativa com escala de zero a três cruzeiras definida da seguinte forma: valor zero (0) para os casos onde a infiltração foi negativa; valor um (1) quando a infiltração fraca; valor (2) quando a infiltração foi moderada; e valor (3) quando a infiltração foi intensa.

III.4.8.b) Análise histológica da glomerulosclerose e fibrose intersticial

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

Para a avaliação do grau de expansão do interstício renal, as lâminas foram coradas pela técnica de Masson e foi utilizada a técnica de contagem de pontos. Esta técnica consiste em um sistema de microscópio acoplado a um monitor de vídeo com uma ocular graticulada de 110 pontos. Foram contados os pontos que correspondiam

à área de expansão do interstício, analisando-se 25 campos consecutivos sob um aumento de 400x. Os resultados são fornecidos em porcentagem da área de expansão do interstício (FI%).

III.4.9. Imuno-histoquímica

Para a técnica de imuno-histoquímica foram utilizados anticorpos específicos para a identificação da expressão de macrófago, linfócitos T, miofibroblastos (α -actina de músculo liso), células em atividade proliferativa (PCNA) e podócitos (WT-1). O controle negativo do método foi realizado em todos os experimentos, omitindo-se o anticorpo primário específico. A metodologia está descrita a seguir. Na tabela 2 estão descritos os anticorpos utilizados para a realização da imuno-histoquímica.

Tabela 2. Anticorpos utilizados na imuno-histoquímica

Antígeno	Tipo	Diluição	Origem
WT-1	Monoclonal camundongo	1:50	Dako, Carpinteria. EUA
Macrófago	Monoclonal camundongo	1:200	Serotec, Raleigh, EUA
Linfócito T	Monoclonal camundongo	1:100	Harlan Sera-Lab, Belton, Inglaterra
Miofibroblasto	Monoclonal camundongo	1:800	Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA
PCNA	Monoclonal camundongo	1:200	Dako, Carpinteria. EUA

III.4.9.a) Desparafinização para reações de imuno-histoquímica

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica, as lâminas passaram por um processo de desparafinização. Após 30 minutos em estufa a 60°C, as lâminas foram imersas em xilol durante 9 minutos, por 3 vezes. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos (2 vezes), em etanol 96% por 3 minutos (2 vezes) e em água destilada.

Finalizado o processo de desparafinização, as lâminas foram hidratadas em solução salina tris-tamponada (TBS, pH 7,6) ou em solução salina fosfato-tamponada (PBS, pH 7,4). A solução TBS foi preparada misturando-se 100 ml de Tris HCl (Serva, Heidelberg, Alemanha) a 0,5M (pH 7,6) com 100 ml de cloreto de sódio a 0,15M (Merck, Darmstadt, Alemanha), completando para um litro com água destilada. A solução PBS foi preparada utilizando-se os reagentes fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) nas concentrações 0,007 M, 0,025 M e 0,14 M, respectivamente. O pH desta solução foi ajustado para 7,4 com ácido clorídrico (Merck, Darmstadt, Alemanha).

III.4.9.b) Técnica de exposição de epítomos para imuno-histoquímica

Durante o processo de fixação pode ocorrer o “mascaramento” de antígenos no tecido, dificultando assim sua detecção. Para aumentar a exposição antigênica foram utilizadas duas técnicas, a técnica do micro-ondas (para macrófago, linfócito, miofibroblasto e PCNA), e a técnica da panela a vapor (para WT-1). No primeiro caso, as lâminas foram imersas em tampão citrato (2,1g de ácido cítrico mono

hidratado, pH 6,0) (Merck, Darmstadt, Alemanha), e levadas para o forno micro-ondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2400 watts durante 15 minutos. Na técnica da panela a vapor, as lâminas foram imersas em tampão citrato previamente aquecido à temperatura de aproximadamente 100°C, e mantidas sob o efeito do vapor por 30 minutos. Ao término do processo, as lâminas foram resfriadas lentamente até atingir a temperatura ambiente, lavadas com água destilada para a retirada do tampão citrato, permanecendo posteriormente em TBS ou PBS.

III.4.9.c) Identificação de podócitos por WT-1

A presença do marcador de podócitos WT-1 foi estudada através da técnica de imunoperoxidase, utilizando o kit NovoLink® (Leica Novocastra, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido). Após a desparafinização e a recuperação de antígenos pela técnica da panela a vapor, as lâminas foram incubadas por 5 minutos com a solução “peroxidase block reagent” para o bloqueio da peroxidase endógena do tecido. Em seguida, foram bloqueados os antígenos inespecíficos presentes no tecido pela incubação por 5 minutos com a “protein block solution”. Em seguida o material foi incubado com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-WT1 (Dako Co, Glostrup, Dinamarca) diluído 1:50 em TBS durante a noite a 4°C, em câmara úmida.

No dia seguinte, as lâminas foram incubadas solução “Post Primary Block” por 30 minutos, seguida do complexo “NovoLink Polymer” por 30 minutos. Todas as etapas foram intercaladas por 2 lavagens de 5 minutos em TBS sob agitação. Controles negativos, nos quais se omitiu o anticorpo primário, foram realizados em todos os casos.

Para a revelação as lâminas foram incubadas com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), diluído em tampão substrato apropriado, fornecido pelo fabricante com duração de aproximadamente 5 minutos. As células positivas apresentaram cor marrom. As lamínulas foram montadas com Glicergel (DAKO, Copenhagen, Dinamarca) previamente aquecido.

III.4.9.d) Identificação de macrófagos, linfócitos T e de miofibroblastos (Técnica da avidina-biotina/fosfatase alcalina)

Após a desparafinização, as lâminas foram colocadas em tampão citrato para a exposição antigênica e levadas ao micro-ondas. Logo em seguida foi realizado o bloqueio da avidina endógena por 15 minutos seguido do bloqueio da biotina endógena por 15 minutos e do bloqueio inespecífico com soro não-imuno de cavalo (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:70, durante 30 minutos. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários específicos, mostrados na tabela 2. A incubação foi realizada durante a noite, a 4°C, em câmara úmida. A seguir, foram incubados com imunoglobulina biotinilada anti-camundongo adsorvida em rato (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:200, durante 45 minutos. Em seguida, foi acrescentado o complexo estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina (Vector, Burlingame, EUA), durante 30 minutos. A seguir foi utilizado o corante fast-red 5 mg diluídos em uma solução denominada “substrato”.

Para se preparar o substrato 2 mg de fosfato de naftol AS-MX (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA), foram diluídos em 200 µl de N,N dimetilformamida (Merck, Darmstadt, Alemanha). A seguida, a solução foi diluída em 9,8 mL de tampão Tris 0,1 M (pH 8,2) e 20 µL de levamisol 1 M (Sigma

Chemical CO, St Louis, EUA) foram acrescentados. Esta solução ficou armazenada a -20°C e, no momento da revelação.

A solução “substrato + fast red” depois de ser preparada foi filtrada e então usada como corante. As células positivas neste tipo de reação apresentam cor vermelha. O tempo de revelação para os diversos antígenos variou de 10 a 30 minutos e a contra-coloração foi feita com hemalumbre de Mayer.

III.4.9.e) Identificação de células em proliferação (Técnica da avidina-biotina/peroxidase)

A identificação de células em proliferação foi realizada através do anticorpo monoclonal anti-PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) de rato produzido em camundongo (DAKO, Carpinteria, EUA) A reação de imuno-histoquímica foi realizada pela técnica avidina/biotina com o complexo “*horseadish peroxidase complex*” (HRP).

Após a desparafinização e a técnica do micro-ondas, as lâminas foram bloqueadas com uma solução de peróxido de hidrogênio 3% em metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 30 minutos. Este bloqueio serviu para inativar a peroxidase endógena. Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas com água destilada e mantidas em PBS. Em seguida, as lâminas foram incubadas com uma solução de avidina (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 minutos, sendo posteriormente lavadas com PBS durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com uma solução de biotina (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 minutos e posteriormente lavadas com PBS por 5 minutos. As lâminas foram então incubadas com soro de cavalo (Vector, Burlingame, EUA), diluído 70 vezes em PBS, durante 30 minutos e, após a retirada do excesso do soro, as lâminas foram incubadas com o

anticorpo primário, durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo absorvido em rato (Vector, Burlingame, EUA) na diluição 1:200 durante 45 minutos. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas com o complexo ABC/peroxidase (Dako, Carpinteria, EUA) por 30 minutos, lavadas novamente com PBS e destinadas à revelação.

Para a revelação as lâminas foram incubadas com uma solução preparada da seguinte maneira: 0,01g de 3-amino-9-etilcarbazol (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram dissolvidos em 2,5 ml de dimetilformamida e, posteriormente, em 47,5 ml de tampão 0,01 M de ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 0,03 M de acetato de sódio (Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA), pH 5,0. Por fim, foi acrescido 0,25 ml de peridrol (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 3%.

A revelação foi realizada sob aumento microscópico de 100 vezes e durou aproximadamente 25 minutos. Em seguida, as lâminas foram contra-coradas com o corante verde de metila a 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha). As células positivas apresentaram a cor marrom-acastanhada.

III.4.10. Análise da imuno-histoquímica

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

III.4.10.a) Análise da CTdmo inoculada na subcapsula renal

Para quantificar a expressão de macrófagos e linfócitos na subcapsula, no córtex e na medula, foi realizada uma análise semiquantitativa com escala de zero a três cruces definida da seguinte forma: valor zero (0) para os casos nos quais a expressão de macrófagos e linfócitos foi negativa; valor um (1) quando a expressão de macrófagos e linfócitos foi fraca; valor (2) quando a expressão de macrófagos e linfócitos foi moderada; e valor (3) quando a a expressão de macrófagos e linfócitos foi intensa. A área total do tecido renal foi analisada, usando aumento de 100x.

III.4.10.b) Cálculo para quantificação de macrófagos e linfócitos

Para a quantificação de macrófagos e linfócitos T, foi realizada a contagem do número de células positivas na área intersticial renal em 50 campos sob o aumento microscópico de 400x. A média foi expressa em células por mm^2 .

III.4.10.c) Cálculo para quantificação de miofibroblastos

A quantidade de miofibroblastos presentes no espaço intersticial foi estimada através da marcação da proteína α -actina de músculo liso presente nas células deste compartimento. Para isto, foi utilizado o método de contagem de pontos. Esta técnica consiste em um sistema de microscópio acoplado a um monitor de vídeo com uma tela graticulada de 110 pontos. Foram contados os pontos em 50 campos, com aumento de 400x. A média foi expressa em pontos por mm^2 .

III.4.10.d) Cálculo para quantificação de células em proliferação

As células em proliferação (glomerulares, tubulares e intersticiais) foram contadas sob aumento microscópico de 400x. Foram contados 50 campos e a média foi expressa em células por mm².

III.4.10.e) Cálculo para quantificação de podócitos

Para a quantificação de WT-1 foi realizada a contagem de números de núcleos positivos de 50 glomérulos/caso, sob o aumento microscópico de 400x. A média foi expressa em números de núcleos positivos por glomérulo.

III.4.11. Análise estatística

A análise estatística foi baseada na comparação de grupos. Inicialmente as diversas variáveis foram testadas para normalidade, caso as amostras apresentassem distribuição normal era aplicado o teste ANOVA, com pós-teste de Tukey caso houvesse diferença estatística. Caso contrário, era aplicado o teste de Kruskal-Wallis para medianas, com pós-teste de Dunn. Na eventualidade de se compararem apenas dois grupos foi utilizado o teste t de Student para amostras não pareadas, com correção de Welch quando as variâncias diferiam, ou o teste de Mann-Whitney, quando os dados eram não-paramétricos. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão e foram considerados estatisticamente significativos quando o p-valor era menor que 0,05. Para efetuar esses cálculos foi empregado o software GraphPad Prism, versão 4.03.

IV. RESULTADOS

IV.1. ISOLAMENTO das CTdmo

No nosso laboratório a padronização da obtenção das CTdmo foi realizada a partir de fêmur de ratos Wistars machos utilizando a técnica de gradiente de densidade por Ficoll-Paque. Esta padronização foi obtida com sucesso, principalmente por ser uma técnica simples de ser realizada. Para cada fêmur de rato foi obtido aproximadamente 2 bilhões de células. Para o critério de contagem foram desconsideradas possíveis presenças de hemácias, células pequenas (linfócitos) (Figura 1).

Figura 1. A imagem ilustra a contagem das células após o isolamento por gradiente de concentração. **A)** menor aumento das células na camara de Neubauer (40x); **B)** aumento que possibilita ver células viáveis de diferentes tamanhos, bem como as células mortas coradas em azul (400x)

IV.2. CARACTERIZAÇÃO CELULAR das CTdmo

As células obtidas a partir da extração por gradiente de concentração foram analisadas por citometria de fluxo. A população mostrou uma ampla marcação celular para CD45 ($50\pm6\%$). O marcador de células endoteliais, CD31, foi expresso em uma pequena parcela população ($7\pm3\%$) e o mesmo foi observado para o marcador CD34 ($11\pm7\%$), característico de CTh. Os marcadores de superfície utilizados para caracterizar a população de CTm, CD44 e CD90, foram identificados em $22\pm4\%$ e $35\pm5\%$ da população celular, mostrando que uma considerável porcentagem da população celular apresenta a característica de células-tronco mesenquimais (**Figura 2**).

Figura 2. Caracterização da população celular de CTdmo a ser inoculada nos ratos Wistar

IV.3. ISOLAMENTO e CULTIVO CELULAR das CTm

As células com morfologia fibroblastóide apresentaram adesão às placas de cultivo depois de serem mantidas por 24 horas em meio de cultura e em ambiente apropriado. As células não aderentes foram removidas da cultura depois de 72 horas de incubação. Após 5 dias de cultura pode-se observar uma diminuição no número de células aderidas devido ao desprendimento de diferentes tipos celulares que não apresentavam morfologia fibroblastóide, como os leucócitos. Com 10 dias de cultivo as células apresentaram uma alta proliferação, com a formação de colônias após 15 dias de cultivo. No 21º dia observou-se um preenchimento de aproximadamente 80% da área total plaqueada (**Figura 3**).

Figura 3. Padronização da técnica de obtenção das CTm. Fotomicrografia realizadas nos períodos de 0, 3, 5, 10, 15 e 21 dias depois de plaqueadas

IV.3.1. Identificação da formação de colônias celulares

As CTm isoladas da medula óssea formaram uma população celular heterogênea, com uma morfologia predominantemente fusiforme e com capacidade de formar colônias semelhantes às de fibroblastos (*fibroblast-like colonies*) (**Figura 4**).

Figura 4. Crescimento celular em colônias com formato fibroblastóide (*fibroblast-like colonies*)

IV.3.2. Diferenciação celular de CTm em linhagem osteogênica

Sob a ação dos estímulos específicos e condições apropriadas, as CTm primárias foram capazes de se diferenciar em osteoblastos (**Figura 5**).

Figura 5. Diferenciação das CTm em células da linhagem osteogênica. **A)** Células não coradas; **B)** Coloração resultante da atividade da fosfatase alcalina produzida pelas células sobre substrato cromogênico; **C)** Coloração vermelho de alizarina para visualização de calcificação

IV.3.3. Caracterização celular das CTm

Os resultados demonstraram que as células mantidas em cultura expressaram com alta intensidade os antígenos de superfície característicos de CTm, CD44 e CD90, presentes em $61\pm 8\%$ e $85\pm 4\%$ da população, respectivamente. Por outro lado, a expressão dos marcadores CD34, CD45 e CD31 foi de baixa intensidade e registrada em apenas $3\pm 0,5\%$, $19\pm 4\%$ e $4\pm 1\%$ da população, respectivamente. Os resultados da imunofenotipagem das CTm estão representados na Figura 5 na forma de histograma (**Figura 6**).

Figura 6. Caracterização celular de marcadores de superfície por citometria de fluxo. CTm foram positivas para CD44 e CD90 e negativas para CD31, CD34 e CD45

IV.4. INOCULAÇÃO de CT na REGIÃO SUBCAPSULAR RENAL

Foram realizados experimentos de transplante de CT via subcapsular renal em 10 ratos Wistar machos normais. O procedimento exigiu muito cuidado para que não ocorresse destruição da cápsula renal e nem hemorragia ao introduzir a agulha de plástico (Figura 7).

Figura 7. Inoculação de CT sob a cápsula renal. A região delimitada indica o local exato que as células foram inoculadas

IV.4.1. Análise da infiltração de CT no tecido renal

A análise histológica por parâmetro semi-quantitativo mostrou a presença das células na região subcapsular 5 dias pós inoculação, além de uma notável infiltração dessas células no córtex, com uma nítida tendência de migração em direção à medula renal. Aos 10 dias pós-inoculação, a infiltração no córtex se acentuou, bem como o número de células infiltradas na região medular. Para os grupos de 15 e 30 dias pós-inoculação observou-se uma estabilização e redução no número das CTdmo tanto no córtex como na medula (Figuras 8 e 9).

Controle

5 dias

Figura 8. Corte histológico de rim de rato 5 dias após a inoculação de CTdmo. **A)** rato controle inoculado com veículo (aumento de 100x); **B)** rato inoculado com CTdmo. As setas mostram a infiltração das células inoculadas via subcapsular renal (aumento de 40x, coloração Tricrômio de Masson)

Figura 9. Análise semi-quantitativa da distribuição das CTdmo inoculadas em ratos machos depois de 5, 10, 15 e 30 dias (coloração Tricrômio de Masson em aumento de 100x)

A infiltração das CTdmo no tecido renal também foi analisada por meio de marcação nuclear com DAPI (**Figura 10A**). A análise mostrou que 1 dia pós-inoculação houve uma expressiva infiltração das células da região subcapsular para o córtex renal (**Figura 10B**). Depois de 5 dias, observou-se uma notável infiltração e distribuição dessas células por toda a região cortical, particularmente nos glomérulos (**Figura 10C**). A mesma distribuição foi observada depois de 15 dias de inoculação (**Figura 10D**). Após 30 dias do transplante das CTdmo ainda foi observada a presença dessas células no tecido renal, apesar da diminuição da intensidade de fluorescência das células bem como de sua quantidade (**Figura 10E**).

Figura 10. Distribuição e localização da CTdmo no tecido renal. **A)** células marcadas pré-inoculação; **B)** 1 dia; **C)** 5 dias; **D)** 15 dias; **E)** 30 dias pós-inoculação no tecido renal

IV.5. PROTOCOLO I – CTdmo em RATOS WISTAR FÊMEAS

Dados do protocolo experimental dos animais que receberam inoculação de CTdmo estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados da pressão caudal, proteinúria, albuminúria e creatinina dos animais que receberam CTdmo

		PA (mm Hg)	U _{prot} (mg/24 h)	U _{alb} (mg/24 h)	S _{creat} (mg/dL)
Sham	15d	96±4	1,7±0,9	0,02±0,01	0,30±0,08
	30d	96±4	0,5±0,1	0,2±0,1	0,49±0,13
Sham+CTdmo	15d	104±5	0,8±0,1	0,1±0,1	0,46±0,04
	30d	142±4 ^a	1,9±1,0	0,5±0,3	0,60±0,04
Nx	15d	151±8 ^{a,c}	19,6±10	6,6±4,5 ^{a,b}	0,70±0,19 ^a
	30d	168±8 ^a	29,1±5,1 ^a	56,3±17,9 ^{a,b}	0,83±0,10
Nx+CTdmo	15d	174±3 ^{a,c}	14,3±5,6	23,8±9,6 ^{a,b,c}	0,81±0,11 ^{a,b}
	30d	177±10 ^a	30,6±6,9 ^a	100,8±33,9 ^{a,b,c}	0,76±0,07

PA: pressão caudal

U_{prot}: proteinúria

U_{alb}: albuminúria

S_{creat}: creatinina

^a p<0,01 vs Sham

^b p< 0,05 vs Sham + CTdmo

^c p< 0,05 vs Nx

IV.5.1. Pressão arterial caudal

Nos animais analisados 15 dias após a lesão, o grupo Nx apresentou grave hipertensão arterial quando comparado com o grupo Sham (151 ± 8 mmHg vs 96 ± 4 mmHg; $p < 0,01$). Os animais do grupo Nx que receberam CTdmo também apresentaram hipertensão grave (174 ± 3 mmHg; $p < 0,05$ vs Nx).

Após 30 dias, tanto o grupo Nx quanto o grupo Nx+CTdmo (168 ± 8 e 177 ± 10 , respectivamente) apresentaram um aumento significativo em relação aos grupos Sham e Sham+CTdmo (96 ± 4 mmHg; $p < 0,01$ e 142 ± 4 mmHg; $p < 0,05$, respectivamente).

Figura 11. Pressão arterial caudal dos animais nos diferentes grupos

IV.5.2. Proteinúria

A análise realizada após 15 dias mostrou que no grupo Nx já houve aumento da proteinúria em relação ao grupo Sham ($19,6 \pm 10$ mg/24h vs $1,7 \pm 0,9$ mg/24h, respectivamente; ns). A inoculação de CTdmo em animais Nx não reduziu significativamente a proteinúria ($14,3 \pm 5,6$ mg/24h vs Nx).

A análise realizada após 30 dias evidenciou que os animais do grupo Nx apresentaram uma proteinúria significativamente maior do que os animais Sham ($30,6 \pm 6,9$ mg/24h vs $0,5 \pm 0,1$ mg/24h; $p < 0,01$). Os animais do grupo Nx+CTdmo apresentaram níveis semelhantes de excreção de proteína urinária com relação ao grupo Nx ($29,1 \pm 5,1$ mg/24h vs Nx; ns).

Figura 12. Proteína urinária dos animais nos diferentes grupos

IV.5.3. Albuminúria

A análise realizada após 15 dias mostrou que o grupo Nx apresentou uma maior excreção de albumina urinária quando comparado com o grupo Sham ($6,6 \pm 4,5$ mg/24h vs $0,02 \pm 0,01$ mg/24h; $p < 0,01$). Os animais Nx inoculados com CTdmo tiveram uma piora da albuminúria comparada ao grupo Nx ($23,8 \pm 9,6$ mg/24h vs Nx; $p < 0,05$).

Após 30 dias a albuminúria nos ratos fêmeas Nx foi significativamente maior do que após 15 dias. Nos animais do grupo Nx+CTdmo houve um aumento significativo da albuminúria em relação ao grupo Nx 30 dias ($100,8 \pm 33,9$ mg/24h vs $56,3 \pm 17,9$, respectivamente; $p < 0,05$). Ambos apresentaram uma maior excreção de albumina urinária em relação ao grupo Sham ($0,2 \pm 0,1$ mg/24h; $p < 0,01$).

Figura 13. Albumina urinária dos animais nos diferentes grupos

IV.5.4. Dosagem de creatinina sérica

O grupo Nx apresentou um aumento significativo da creatinina sérica aos 15 dias em comparação ao grupo Sham ($0,70 \pm 0,09$ mg/dL vs $0,30 \pm 0,08$ mg/dL, respectivamente; $p < 0,01$). A inoculação de CTdmo nos animais Nx não teve impacto na função renal mantendo elevado os níveis de creatinina sérica ($0,81 \pm 0,11$ mg/dL vs Nx; ns).

Os animais após 30 dias de Nx apresentaram elevada concentração sérica de creatinina em relação aos animais Sham ($0,83 \pm 0,10$ mg/dL vs $0,39 \pm 0,13$ mg/dL; respectivamente; $p < 0,01$). O grupo Nx+CTdmo apresentou níveis séricos de creatinina semelhantes ao grupo Nx ($0,76 \pm 0,07$ mg/dL vs Nx; ns).

Figura 14. Creatinina sérica dos animais nos diferentes grupos

IV.5.5. Análise dos marcadores inflamatórios e da atividade proliferativa

IV.5.5.a) *Macrófagos*

A distribuição de macrófagos no tecido renal foi analisada através de escores semi-quantitativos.

Na região subcapsular, 5 dias pós-inoculação a presença de macrófagos foi marcante. Após 15 dias houve uma diminuição do número dessas células, com um aumento marcante 30 dias pós-inoculação. A presença das células na região subcapsular 10 dias após a inoculação não pôde ser analisada devido à perda cápsula.

Na região cortical, notou-se uma grande quantidade de macrófagos 5 e 10 dias pós-inoculação, havendo uma discreta redução do número de células 15 e 30 dias após o inóculo.

Na região medular observou-se um número reduzido de células 5 dias após a inoculação, um aumento discreto da quantidade de células após 10 dias, e aos 15 e 30 dias após a inoculação o número de células nesta região voltou a ser reduzido.

Figura 15. Fotomicrografia ilustrativa de rim após 15 dias de inoculação (Aumento 200x)

Figura 16. Expressão de macrófagos em rins de ratos após 5, 10, 15 e 30 dias da inoculação subcapsular de CTdmo

IV.5.5.b) Linfócitos

A análise da região subcapsular mostrou que 5 dias pós-inoculação uma grande quantidade de linfócitos permanecia nesta região. Uma marcante redução do número de células foi observado após 10 dias. Foi notado um aumento aos 15 dias que se manteve aos 30 dias pós-inóculo.

Na região cortical uma quantidade moderada de células foi observada 5 dias após o inóculo, havendo um aumento considerável aos 10 dias, uma redução aos 15 dias e um novo aumento aos 30 dias.

Analisando a região medular notamos um número moderado de linfócitos aos 5 dias pós-inoculação, uma quantidade maior 10 dias pós-inóculo, uma diminuição aos 15 dias e um aumento aos 30 dias.

Figura 17. Fotomicrografia ilustrativa de rim após 15 dias de inoculação (Aumento 200x)

Figura 18. Expressão de linfócitos em rins de ratos após 5, 10, 15 e 30 dias da inoculação subcapsular de CTdmo

IV.5.5.c) PCNA

A presença de células em proliferação na região subcapsular foi moderada aos 5 dias pós inoculação, muito baixa aos 15 dias e indetectável aos 10 e 30 dias pós-inoculação.

Na região cortical notou-se uma quantidade marcante de células em proliferação 5 dias após inoculação, seguido de uma redução considerável aos 10 dias. A quantidade de células manteve-se em níveis similares aos 15 e 30 dias.

O padrão de células em proliferação na região medular foi semelhante ao verificado na região cortical.

Figura 19. Fotomicrografia ilustrativa de rim após 15 dias de inoculação (aumento de 400x)

Figura 20. Expressão de PCNA em rim de rato após 5, 10, 15 e 30 dias da inoculação de CTdmo na região subcapsular renal

IV.6. PROTOCOLO II - CTm em RATOS WISTAR MACHOS

Dados do protocolo experimental dos animais que receberam inoculação de CTm estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados do peso, pressão caudal, albuminúria, creatinina sérica e histologia nos diferentes grupos de animais do protocolo experimental com CTm

		PA (mm Hg)	U _{prot} (mg/24 h)	U _{alb} (mg/24 h)	S _{creat} (mg/dL)	GS (%)	FI (%)
Sham	15d	131±3	12,7±0,8	1,1±0,3	0,4±0,1	0,2±0,2	0,15±0,02
	30d	123±3	10,9±0,9	1,2±0,4	0,5±0,1	0,3±0,3	0,20±0,06
Sham+PBS	15d	126±1	7,0±1,3	0,5±0,1	0,5±0,5	-	-
	30d	131±3	9,8±1,0	0,5±0,2	0,4±0,1	-	-
Sham+CTm	15d	122±3	8,6±1,3	0,9±0,6	0,3±0,5	0,3±0,3	0,44±0,14
	30d	132±4	7,4±1,3	0,4±1,0	0,3±0,5	1,3±1,1	0,38±0,06
Nx	15d	156±8 ^{a,b,c}	39,9±1,8 ^{a,b,c}	41,7±10,8 ^{a,b,c}	1,0±0,1 ^{a,b,c}	13±3,0 ^{a,c}	0,77±0,08 ^a
	30d	183±6 ^{a,b,c}	98,6±14,5 ^{a,b,c}	138,3±22,7 ^{a,b,c}	1,0±0,1 ^{a,b,c}	22,0±6,1 ^{a,c}	1,42±0,11 ^{a,c}
Nx+PBS	15d	169±11 ^{a,b,c}	32,9±3,7 ^{a,b,c}	44,3±11,7 ^{a,b,c}	1,0±0,1 ^{a,b,c}	-	-
	30d	184±7 ^{a,b,c}	123,7±19,8 ^{a,b,c}	169,8±22,7 ^{a,b,c}	0,9±0,1 ^{a,b,c}	-	-
Nx+CTm	15d	127±7 ^{d,e}	25,0±8,3	4,6±1,5 ^{d,e}	0,5±0,1 ^{d,e}	9,7±2,1	0,90±0,05
	30d	158±4 ^{d,e}	34,7±6,2 ^{d,e}	24,1±7,7 ^{d,e}	0,6±0,1 ^{d,e}	5,4±2,5 ^e	1,15±0,07

PA: pressão caudal
U_{prot}: proteinúria
U_{alb}: albuminúria
S_{creat}: creatinina sérica
GS: glomeruloesclerose
FI: fibrose intersticial

^a p < 0,01 vs Sham
^b p < 0,05 vs Sham + PBS
^c p < 0,05 vs Sham + CTm
^d p < 0,001 vs Nx
^e p < 0,001 vs Nx + PBS

IV.6.1. Pressão arterial caudal

Após 15 dias, o grupo Nx apresentou um aumento significativo da pressão arterial em relação ao grupo Sham (156 ± 8 mmHg vs 131 ± 3 mmHg, respectivamente; $p < 0,01$). A inoculação de CTm nos animais Nx (Nx+CTm) promoveu uma diminuição significativa da pressão arterial em relação ao grupo Nx (127 ± 7 mm/Hg; $p < 0,0001$ vs Nx).

Nos animais analisados 30 dias após a ablação renal, a pressão arterial foi significativamente mais elevada no grupo Nx do que o grupo Sham (183 ± 6 mmHg e 123 ± 3 mm/Hg, respectivamente; $p < 0,01$). A inoculação de CTm diminuiu significativamente a pressão caudal em relação ao grupo Nx (158 ± 1 mmHg; $p < 0,0001$ vs Nx).

A análise da pressão arterial nos animais que foram submetidos à manipulação subcapsular e que receberam somente o veículo (Sham+PBS e Nx+PBS), tanto após 15 como após 30 dias, não mostrou diferenças em relação aos grupos que não receberam o veículo.

Figura 21. Pressão arterial caudal dos animais nos diferentes grupos

IV.6.2. Proteinúria

Aos 15 dias, os animais do grupo Sham tiveram proteinúria dentro de valores normais ($12,7 \pm 0,8$ mg/24h), sendo que no grupo Nx foi verificado aumento significativo da proteinúria ($39,9 \pm 1,8$ mg/24h; $p < 0,001$ vs Sham). A inoculação de CTm no grupo Nx não evidenciou afeto os níveis de proteinúria ($25,0 \pm 8,3$ mg/24h vs Nx; ns).

Após 30 dias, o grupo Nx apresentou grave proteinúria ($98,6 \pm 14,5$ mg/24h vs $10,9 \pm 0,9$ mg/24h Sham; $p < 0,01$) que foi reduzida significativamente no grupo Nx+CTm ($34,7 \pm 6,2$ mg/24h; $p < 0,0001$ vs Nx).

A aplicação do veículo (PBS) na região subcapsular não induziu alterações relevantes em relação aos grupos que não receberam o veículo, tanto após 15 como após 30 dias.

Figura 22. Proteinúria dos animais nos diferentes grupos

IV.6.3. Albuminúria

Após 15 dias, o grupo Nx apresentou albuminúria elevada em relação ao grupo Sham ($41,7 \pm 10,8$ mg/24h vs $1,1 \pm 0,3$ mg/24h, respectivamente; $p < 0,01$). A inoculação de CTm em animais Nx diminuiu significativamente a albuminúria ($4,6 \pm 1,5$ mg/24h; $p < 0,0001$ vs Nx).

Após 30 dias, o grupo Nx evoluiu com aumento significativo de albuminúria ($138,3 \pm 22,7$ mg/24h vs $1,2 \pm 0,4$ mg/24h; $p < 0,01$ vs Sham). Uma significativa redução da albuminúria foi evidenciada no grupo Nx+CTm ($24,1 \pm 7,7$ mg/24h; $p < 0,001$ vs Nx).

As albuminúrias nos grupos Sham+PBS e Nx+PBS, animais que foram submetidos à manipulação subcapsular e que receberam somente o veículo (PBS), após 15 e 30 dias, não apresentaram alterações relevantes em relação aos grupos que não receberam o veículo.

Figura 23. Albuminúria dos animais nos diferentes grupos

IV.6.4. Dosagem de creatinina sérica

A análise dos níveis de creatinina sérica revelou que com 15 dias após o inóculo, o grupo Nx apresentou níveis mais elevados em relação ao Sham ($1,0 \pm 0,07$ mg/24h vs $0,4 \pm 0,1$ mg/24h; $p < 0,001$). As CTm inoculadas na região da subcapsula renal reduziram significativamente a concentração sérica de creatinina nos animais Nx ($0,5 \pm 0,1$ mg/24h; $p < 0,05$ vs Nx).

Após 30 dias, o grupo Nx manteve níveis mais elevados de creatinina em relação ao Sham ($1,0 \pm 0,15$ mg/24h vs $0,5 \pm 0,1$ mg/24h; $p < 0,01$). Por outro lado, os animais Nx que receberam CTm apresentaram uma diminuição significativa da creatinina sérica em relação ao grupo Nx ($0,6 \pm 0,1$ mg/24h; $p < 0,05$ vs Nx).

As concentrações de creatinina sérica nos grupos Sham+PBS e Nx+PBS não apresentaram diferenças em relação aos grupos que não receberam o veículo.

Figura 24. Creatinina sérica dos animais nos diferentes grupos

IV.6.5. Glomeruloesclerose

Como esperado, a indução de nefropatia no grupo Nx caracterizou-se por uma alta porcentagem de glomérulos esclerosados ($12,6 \pm 3,0\%$ vs $0,2 \pm 0,2\%$ Sham; $p < 0,01$) depois de 15 dias de nefrectomia 5/6. Nos animais do grupo Nx+CTm 15 dias não foi observada redução importante da glomeruloesclerose ($9,7 \pm 2,1\%$; ns vs Nx).

Após 30 dias, o grupo Nx apresentou grave glomeruloesclerose em relação ao grupo Sham ($22,0 \pm 6,1\%$ vs $0,3 \pm 0,3\%$; $p < 0,01$ vs Sham). A inoculação de CTm no grupo Nx (Nx+CTm) promoveu uma redução significativa da glomeruloesclerose em relação ao grupo Nx ($5,4 \pm 2,5\%$; $p < 0,001$ vs Nx). A Figura 18 ilustra cortes histológicos de rins de animal Sham, animal com lesão renal 5/6 e animal com lesão renal 5/6 tratado com CTm.

Figura 25. Índice de glomeruloesclerose nos diferentes grupos

Sham

Nx

Nx + CTm

Figura 26. Avaliação histológica de glomeruloesclerose: **A)** rato normal; **B)** animal Nx 5/6; **C)** animal Nx que recebeu CTm

IV.5.6. Fibrose Intersticial

Após 15 dias de ablação renal, já foi observado um aumento significativo da porcentagem da área intersticial no grupo Nx ($0,77 \pm 0,08\%$ vs $0,15 \pm 0,02$ Sham; $p < 0,01$). A inoculação das CTm em animais com ablação renal (Nx+CTm) não proporcionou diminuição na porcentagem da área intersticial ($0,90 \pm 0,05\%$; ns vs Nx).

Após 30 dias, o grupo Nx apresentou importante fibrose intersticial em relação ao grupo Sham ($1,42 \pm 0,11\%$ vs $0,20 \pm 0,06\%$, $p < 0,01$ vs Sham). O grupo Nx+CTm apresentou redução da área intersticial em relação ao grupo Nx, porém sem significância estatística ($1,15 \pm 0,07\%$; $p < 0,05$ vs Nx).

Figura 27. Índice de fibrose intersticial nos diferentes grupos

Sham

Nx

Nx + CTm

Figura 28. Avaliação histológica de fibrose intersticial: **A)** rato normal; **B)** animal Nx 5/6; **C)** animal Nx que recebeu CTm

IV.5.7. Análise por Imuno-histoquímica

Métodos de imuno-histoquímica foram utilizados para identificar podócitos (através da detecção de WT-1), macrófagos, linfócitos T, miofibroblastos (através da detecção de α -actina de músculo liso) e células em proliferação (através da detecção por PCNA).

Tabela 4. Resultados da imuno-histoquímica nos diferentes grupos de animais do protocolo experimental com CTm.

		WT-1 (n° núcleos/glom)	Macrófagos (cél/mm ²)	Linfócitos (cél/mm ²)	Miofibroblastos (pontos/mm ²)	PCNA (n° núcleos/mm ²)
Sham	15d	7,6±0,5	13,6±2,0	15,7±0,5	26,2±4,3	12,4±2,4
	30d	7,0±0,4	16,9±2,7	14,1±2,9	13,0±3,0	10,3±0,3
Sham+CTm	15d	6,5±0,1	16,5±4,2	13,3±2,0	30,2±11,9	8,5±1,5
	30d	7,0±0,4	18,7±3,4	21,1±5,2	19,3±6,2	14,3±2,0
Nx	15d	5,5±0,2 ^a	25,1±2,9	21,7±2,5	123,3±26,5 ^{a,b}	46,7±15,8
	30d	5,1±0,2 ^{a,b}	50,3±8,1 ^{a,b}	32,7±6,0 ^a	250,6±29,6 ^{a,b}	73,3±9,8 ^{a,b}
Nx+CTm	15d	6,6±0,3	31,6±2,2 ^{a,b}	22,8±3,3	41,0±5,4 ^e	60,4±21,0
	30d	6,9±0,4 ^c	38,6±3,9	25,3±2,1	106,3±16,9 ^{a,e}	43,7±10,3 ^a

^a p<0,01 vs Sham
^b p< 0,05 vs Sham+CTm
^c p< 0,01 vs Nx

IV.5.7.a) WT-1

A análise dos podócitos foi realizada através da expressão de WT-1 e quantificada por núcleos de células glomerulares positivas. Após 15 dias, o grupo Nx mostrou uma diminuição significativa na expressão de WT-1 em relação ao grupo Sham ($5,5 \pm 0,2$ vs $7,6 \pm 0,5$ células positivas/glomérulo, respectivamente; $p < 0,01$). Um discreto aumento da expressão de WT-1 foi observado no grupo Nx+CTm após 15 dias ($6,6 \pm 0,3$; ns vs Nx).

Nos animais avaliados após 30 dias, foi observada uma diminuição significativa do número de podócitos no grupo Nx ($5,1 \pm 0,2$) quando comparado com os grupos Sham e Sham+CTm ($7,0 \pm 0,4$ e $7,0 \pm 0,4$, respectivamente; $p < 0,01$). A inoculação de CTm promoveu um aumento significativo na expressão de WT-1 ($6,9 \pm 0,4$; $p < 0,05$ vs Nx).

Figura 29. Expressão de WT-1 em glomérulos nos diferentes grupos

Sham **Nx** **Nx + CTm**

Figura 30. Expressão de WT-1 (podócitos) em glomérulos, identificada por imunohistoquímica, nos grupos Sham, Nx, Nx+CTm, no período de 30 dias (aumento de 400x)

IV.5.7.b) *Macrófagos*

A quantificação da expressão de macrófagos foi realizada no interstício renal. Após 15 dias de nefrectomia 5/6, os animais apresentaram um discreto aumento do número de macrófagos no rim remanescente quando comparados com ao grupo Sham ($25,1 \pm 2,9$ céls/mm² e $13,6 \pm 2,0$ céls/mm², respectivamente). Os animais do grupo Nx+CTm apresentaram um aumento significativo nos números de macrófagos no interstício renal aos 15 dias ($31,6 \pm 2,2$ céls/mm² vs Sham; $p < 0,01$), porém não significativo.

Após 30 dias, os animais do grupo Nx apresentaram um marcante aumento do número macrófagos no interstício renal comparado com o grupo Sham ($50,3 \pm 8,1$ céls/mm² e $16,9 \pm 2,7$ céls/mm², respectivamente; $p < 0,01$). Após 30 dias foi observado uma diminuição do número de macrófagos nos animais Nx que receberam CTm ($38,6 \pm 3,9$; ns vs Nx).

Figura 31. Resultados do número de macrófagos no interstício renal nos diferentes grupos, tanto em 15 dias como em 30 dias

Sham **Nx** **Nx + CTm**

Figura 32. Macrófagos identificados por imuno-histoquímica na região do interstício renal nos grupos Sham, Nx, Nx+CTm no período de 30 dias (aumento de 400x)

IV.5.7.c) Linfócitos

Linfócitos foram observados no interstício renal de todos os grupos analisados. Aos 15 dias tanto o grupo Nx quanto o grupo Nx+CTm apresentaram um aumento discreto de linfócitos T no interstício renal ($21,7 \pm 2,5$ céls/mm² e $22,8 \pm 3,3$ céls/mm², respectivamente) com relação os animais dos grupos Sham e Sham+CTm ($15,7 \pm 0,5$ céls/mm² e $13,3 \pm 2,0$ céls/mm², respectivamente).

Após 30 dias, houve um aumento significativo do número de linfócitos no grupo Nx comparado com o grupo Sham ($32,7 \pm 6,0$ céls/mm² vs $14,1 \pm 2,9$ céls/mm² Sham; $p < 0,01$). A inoculação de CTm nos animais Nx promoveu uma diminuição do número de linfócitos T, porém não significativo ($25,3 \pm 2,1$ céls/mm²; ns vs Nx).

Figura 33. Resultados do número de linfócitos T nos diferentes grupos tanto em 15 dias como em 30 dias

Sham **Nx** **Nx + CTm**

Figura 34. Linfócitos T no interstício renal nos grupos Sham, Nx e Nx+CTm no período de 30 dias (aumento de 400x)

IV.5.7.d) *Miofibroblastos*

A expressão de α -actina de músculo liso foi encontrada de forma constitutiva no tecido renal em células de musculatura lisa vascular. No entanto, a marcação para α -actina no interstício renal identificou a presença de miofibroblastos neste compartimento. Todos os animais apresentam marcação para esta proteína nos vasos renais, o que não foi contabilizado na presente análise.

Aos 15 dias, a expressão de α -actina no grupo Nx foi significativamente maior em relação ao grupo Sham ($123,3 \pm 26,5$ pontos/mm² vs $26,2 \pm 4,3$, respectivamente; $p < 0,01$). A inoculação das CTm reduziu significativamente a expressão da proteína ($41,0 \pm 5,4$ $p < 0,05$ vs Nx).

A diferença se acentuou após 30 dias, onde animais Nx apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo Sham ($250 \pm 29,6$ vs $13,0 \pm 3,0$, respectivamente; $p < 0,01$). Os animais Nx que receberam CTm apresentaram uma expressão significativamente menor em relação ao grupo Nx ($106,3 \pm 16,9$; $p < 0,01$).

Figura 35. Resultados da expressão de α -actina no tecido renal dos diferentes grupos, refletindo o número de miofibroblastos neste compartimento

Sham **Nx** **Nx + CTm**

Figura 36. Expressão de α -actina identificada por imuno-histoquímica na região do interstício renal nos grupos Sham, Nx, Nx+CTm no período de 30 dias (aumento de 200x)

IV.5.7.e) *Atividade proliferativa celular*

A análise das células em proliferação celular foi detectada pela expressão de PCNA e a quantificação dessas células foi realizada nos diferentes compartimentos do rim remanescente: glomérulo, túbulo e interstício.

Aos 15 dias, houve um aumento da expressão nos grupos Nx e Nx+CTm ($46,7 \pm 15,8$ e $60,4 \pm 21,0$, respectivamente; ns vs Sham) em relação aos grupos Sham e Sham+CTm ($12,4 \pm 2,4$ e $8,5 \pm 1,5$, respectivamente).

Após 30 dias, o grupo Nx apresentou uma aumento significatido das células em proliferação em relação ao grupo Sham ($73,7 \pm 9,8$ vs $10,32 \pm 0,3$, respectivamente; $p < 0,05$). Entretanto, apesar da inoculação de CTm promover uma diminuição do número de células em atividade proliferativa ($43,7 \pm 10,3$; ns vs Nx) ainda foi significativamente maior em relação ao grupo Sham ($p < 0,05$).

Figura 37. Resultados da atividade proliferativa nas diferentes regiões do tecido renal nos diferentes grupos

Sham **Nx** **Nx + CTm**

Figura 38. Expressão de PCNA identificada por imuno-histoquímica nas regiões glomerulares, tubulares e intersticiais nos grupos Sham, Nx, Nx+CTm no período de 30 dias (aumento de 200x)

DISCUSSÃO

CT apresentam potencial terapêutico para a doença renal crônica pela capacidade de diferenciação e modulação do microambiente da lesão, possibilitando a regeneração tecidual e recuperação funcional. Estes importantes aspectos têm motivado o estudo do potencial terapêutico de CT, em modelos experimentais de lesão renal aguda e crônica.

No presente estudo além de analisar os possíveis efeitos renoprotetores destas células em modelo de ablação 5/6, também foi estudada uma via alternativa de inoculação das CT, com o objetivo de disponibilizar e assegurar um maior número de CT próximo ao local de lesão. Neste contexto, considerando que para as CT desempenharem seu efeito local é necessário que as mesmas migrem para a região da lesão e aí permaneçam por um certo período, o presente projeto inicialmente avaliou a oferta de um número elevado de células-tronco inoculadas próximo à região da injúria, assim como a sua permanência no local da lesão renal. Para tanto, a via escolhida para proporcionar esta oferta e permanência local de CT foi inoculação na região subcapsular. O tráfego das CT para o parênquima renal foi observado através de técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência.

Os resultados obtidos mostraram que houve migração e distribuição das células a partir desta região em direção à cortical e à medular. Observando o padrão de distribuição ao longo do tempo, verificou-se que após 5 dias a concentração celular se

mantteve na região subcapsular. Nas regiões cortical e medular, o pico de concentração de infiltração de células foi observado após 10 dias de inoculação da CT. Essa concentração celular nas regiões subcapsular e cortical manteve-se constante após 15 e 30 dias.

O mesmo padrão foi observado por DAPI-imunofluorescência após 5, 10 e 15 dias e ainda aos 30 dias após a inoculação, quando houve queda do sinal fluorescente, mas ainda assim foi possível detectar um bom número de células no tecido. Ou seja, a inoculação das CT na região subcapsular renal proporcionou uma migração das CT através do córtex, infiltrando os glomérulos e o interstício, chegando até a região medular, indicando haver efetivamente a disponibilidade de CT no local da lesão por um período prolongado. Estes resultados são inéditos, pois até o presente momento nenhum outro grupo de pesquisa demonstrou a distribuição e o tráfego dessas células após a inoculação na região da subcapsula renal.

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

A maioria dos estudos com CT utiliza vias de inoculação endovenosa ou intra-arterial e demonstraram que ambas as vias não foram eficientes para oferecer as CT ao

órgão-alvo (Ito et al, 2001; Kunter et al., 2006; Hauger et al., 2006). A administração de CT via artéria renal possibilitou que apenas 8% das células inoculadas fossem identificadas na região da lesão (Kunter et al., 2006; Hauger et al., 2006). Outra possível explicação para essa dificuldade das células quando inoculadas no fluxo sanguíneo infiltrarem no tecido foi proporcionada pelo estudo de Rombouts et al, que descreveram a perda da capacidade de migração das CTm de camundongos depois de serem cultivadas *ex vivo* (Rombouts et al, 2003).

Outro grupo que procurou quantificar a porcentagem de células que migraram para o tecido renal foi de Ito e colaboradores, que inoculou CTdmo de ratos machos expressando proteína verde fluorescente (GFP) em fêmeas irradiadas. Depois de 21 dias após a indução da doença glomerular por anti-Thy1.1 e de receber o transplante de CT de medula óssea, cerca de 11-12% de células estavam presentes no tecido renal (Ito et al, 2001). Poulsom e col também observaram que em receptores do sexo masculino que receberam rim de pacientes do sexo feminino, 7,9% das células epiteliais corticais eram positivas para o cromossomo Y (Poulsom et al., 2001). Resultados similares foram obtidos pelo grupo de Gupta, que observou que 1% das células no tecido renal continha positividade para o cromossomo Y (Gupta et al., 2002). Esses resultados indicam que apenas uma baixa quantidade de CT pode ser localizada no órgão alvo quando inoculadas pelas vias intra-arterial e venosa.

Parece razoável supor que a entrega de um número elevado dessas células no local de lesão, além de proporcionar um período mais longo para a interação com as células lesadas, pode ser importante para que as CT desempenhem uma efetiva

regeneração tecidual. Quando inoculadas por via intra-arterial ou endovenosa, além de dependerem de citocinas liberadas pela lesão tecidual para que ocorra o *homing* dessas células para a região da injúria, também são dependentes do fluxo sanguíneo, e têm uma passagem rápida pelo órgão-alvo. Por outro lado, a inoculação subcapsular permite que um número maior de células possa atingir e permanecer na região da lesão.

No presente estudo, primeiramente foi analisado o efeito da inoculação da CTdmo em modelo de doença renal crônica progressiva (ablação 5/6). Para a extração das CTdmo foi utilizada a técnica de separação por gradiente de densidade. Nessa extração, o halo que forma é de células mononucleares presentes na medula óssea, ou seja, CT, células progenitoras, células já diferenciadas e principalmente macrófagos e linfócitos. A caracterização da população celular presente neste halo comprovou exatamente essa composição. A predominância das células inflamatórias foi detectada pela expressão de CD-45, enquanto que em menor quantidade foi detectada a presença de CTm e menor ainda de CTh e de células endoteliais. Estes resultados estão em concordância com trabalhos apresentados por diferentes pesquisadores (Shichinohi et al., 2009 e Perruche et al., 2004). De fato, o presente estudo mostrou a expressão dos marcadores inflamatórios (macrófagos e linfócitos) após a inoculação de CTdmo no tecido renal. O número de células positivas para ambos os marcadores inflamatórios foi elevado já com 5 dias de inoculação e manteve-se elevado até o 30º dia pós inoculação, mostrando assim que o número de células inflamatórias inoculadas era bastante elevado.

Com relação à avaliação *in vivo* das CTdmo no modelo de ablação 5/6, todos os parâmetros usados para avaliar a função renal, como pressão arterial, proteinúria,

albuminúria e creatinina sérica pioraram após a inoculação destas células. Achados diferentes foram obtidos por diferentes grupos de pesquisadores. Broekema e colaboradores, em modelo de insuficiência renal aguda, após inocularem as CTdmo pela veia caudal, constataram um efeito benéfico dessas células, além de evidenciarem uma melhora na lesão histológica (Broekema et al.). O mesmo achado renoprotetor foi demonstrado pelo grupo de Li e colaboradores no modelo de mesangiólise associado a nefrectomia unilateral. Eles demonstraram que essas células proporcionaram uma redução na excreção de proteína urinária e nos níveis séricos da uréia e de creatinina. Ao analisarem a histologia, observaram que estas células influenciaram na diminuição do índice de glomeruloesclerose assim como da expansão mesangial (Li et al., 2007). Uchimura e colaboradores, após inocular CTdmo em modelo anti-Thy-1 evidenciaram um efeito antiinflamatório, antifibrótico e uma proteção contra glomeruloesclerose (Uchimura et al., 2005). Esses resultados contraditórios em relação aos nossos podem ser um efeito da via de inoculação das CTdmo utilizada no presente estudo, pois ao mesmo tempo em que proporcionou a presença efetiva e por tempo prolongado das CT no local da lesão, também permitiu que as outras células presentes no halo de CTdmo, principalmente macrófagos e linfócitos, permanecessem na região lesionada. Essas células inflamatórias participam do processo inflamatório e liberam citocinas que podem desencadear uma piora da doença renal e que levam à formação de fibrose tecidual.

Assim, embora a inoculação das CTdmo na região subcapsular renal tenha proporcionado maior oferta e maior permanência na região da injúria renal, não promoveu efeito renoprotetor. Diante destes resultados, optamos pela mudança do tipo

de CT inoculada para evitar uma grande oferta de células inflamatórias. Os experimentos seguintes foram feitos utilizando-se CTm para avaliar se estas células são capazes de promover efeito renoprotetor. Para tanto, foi feito o isolamento das CTm através da aderência em placas de cultura e realizada a caracterização da população celular e a análise da sua capacidade de diferenciar em outra linhagem celular.

Após a padronização da forma de inoculação das CT para o presente projeto, foi necessário padronizar o isolamento por aderência em cultura celular das CTm. Embora as técnicas utilizadas sejam simples de serem executadas, a obtenção de uma população rica em CTm consome um tempo prolongado, de semanas a meses em cultura. Além disso, dificuldades foram encontradas para determinar o melhor protocolo a ser utilizado nas nossas condições laboratoriais.

Por não existir um marcador específico para determinar a população celular de CTm, o uso combinado de marcadores de superfície e a exclusão de outros auxiliou na caracterização das CT isoladas. Em nossos experimentos, usando citometria de fluxo, a grande maioria das células derivadas da medula óssea aderentes, após a quarta passagem expressou intensamente CD44 e CD90 e apresentou baixa expressão para CD34, CD45 e CD31, indicando que as células isoladas e mantidas em cultura era uma população predominante de CTm e não de CTh, ou células leucocitárias e endoteliais, respectivamente. Estes resultados estão em concordância com diversos trabalhos publicados (Meirelles et. al., 2006; Mias et. al., 2008; Sun et. al., 2008).

As CTm isoladas de medula óssea de ratos além de apresentarem marcadores de superfície para CTm também mantiveram a sua capacidade de diferenciação celular *in*

vitro. Nossos resultados demonstraram que as células isoladas de medula óssea e cultivadas, quando colocadas sob condições favoráveis e estímulos adequados foram capazes de se diferenciarem em linhagem osteogênica. As células diferenciadas possuíam morfologia de osteoblasto, expressaram atividade para fosfatase alcalina e apresentaram depósito de fosfato de cálcio, comprovando assim a sua plasticidade celular ainda *in vitro*. Diversos trabalhos demonstraram exatamente essa capacidade das CT se diferenciar em qualquer outra linhagem celular. O primeiro grupo a demonstrar essa capacidade foi o grupo de Pittenger, cujo experimento *in vitro* foi capaz de comprovar essa plasticidade das CTm quando estimuladas com meios de culturas específicos. As células obtidas por este grupo foram de linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica (Pittenger et al., 1999). Outros trabalhos também comprovaram que as CTm eram capazes de se diferenciar em outras linhagens como, cardiomiócitos (Cui et al., 2007) neurônios (Chen et al., 2009) e ilhotas pancreáticas (Choi et al., 2005).

Esses achados da característica populacional e da plasticidade *in vitro* de se diferenciar em linhagem osteogênica, asseguram que as células utilizadas em nossos experimentos eram CTm.

A inoculação de CTm na região subcapsular no modelo de nefropatia crônica progressiva por ablação 5/6 promoveu uma significativa melhora da hipertensão arterial, da proteinúria, albuminúria, da função renal e da glomeruloesclerose, efeitos já detectados após 15 dias da indução da lesão e mais consistentes depois de 30 dias.

Como já solidamente conhecido, no modelo de ablação renal ocorre acentuada hipertensão arterial. Surpreendentemente, nos animais Nx que receberam CTm houve melhora significativa dos níveis da pressão arterial, demonstrando um efeito protetor hemodinâmico. Os mecanismos envolvidos nesta melhora hemodinâmica não estão claros. Nos experimentos realizados por Kunter e colaboradores em modelo de glomerulonefrite induzido por anti-Thy1.1 e que receberam CTm na artéria renal não houve melhora na hipertensão arterial (Kunter et al., 2007). Uma possível explicação para a melhora da hipertensão arterial observada no presente estudo seria decorrente da melhora da lesão renal induzida pelas CTm. As alterações benéficas induzidas pelas CTm no microambiente renal podem ter contribuído para um novo equilíbrio entre os substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras. Outra possível explicação poderia envolver a regulação do sistema renina angiotensina local induzida pela inoculação das CTm. No entanto, não podemos afirmar, visto que foi nenhuma investigação específica foi realizada.

Devem ser ressaltados também os interessantes achados induzidos pela inoculação de CTm neste modelo referentes à marcante diminuição dos principais marcadores de doença renal ablação 5/6, que são a proteinúria e a albuminúria. Existem poucas estratégias terapêuticas que conseguem reduzir a proteinúria e albuminúria no modelo de doença renal crônica progressiva, incluindo basicamente os bloqueadores do sistema renina angiotensina, quer pelo uso de inibidores de enzima de conversão e/ou bloqueadores de receptores de angiotensina II (Graciano et al., 2004; Fujihara et al., 2000). Os resultados do presente estudo são surpreendentes, pois revelam um importante

papel renoprotetor. Utilizando o mesmo modelo, Semedo e colaboradores observaram diminuição da proteinúria nos animais somente após 3 inoculações de CTm. Redução da proteinúria também foi observada no modelo de glomerulonefrite anti-Thy-1 (Kunter et al., 2007).

Os mecanismos envolvidos na redução da proteinúria e da albuminúria também não estão claros. Podem ser consequência da melhora da lesão renal como um todo, melhora dos mecanismos hemodinâmicos ou mesmo secundários à regeneração celular e/ou liberação de fatores de crescimento pelas CTm. Na tentativa de avançar na compreensão dos efeitos das CTm no nível celular, foi feita a pesquisa do marcador WT1. Sua expressão é perdida nos glomérulos colapsados, desaparece, o que indica que o fenótipo do podócito é desregulado (Yuan et al., 2002). Células precursoras de podócitos e estágios subsequentes expressam abundantemente a proteína WT1 e esta expressão faz com que ela seja um marcador específico de podócitos (Mundel et al., 1997a). De fato, a análise do marcador WT-1, mostrou uma diminuição significativa da expressão desse marcador em animais Nx, enquanto que a inoculação de CTm nestes animais promoveu um marcante aumento do número de podócitos.

No presente estudo evidenciamos também uma melhora dos níveis de creatinina nos animais Nx que receberam CTm. Resultados semelhantes foram descritos por dois outros grupos que demonstraram uma marcante melhora da função renal. (Semedo et al., 2009 e Caldas et al., 2009), assim como foi observado melhora dos níveis de creatinina no modelo GN anti-Thy-1 (Kunter et al., 2006; Kunter et al., 2007) e em camundongos com deficiência na cadeia- $\alpha 3$ do colágeno tipo IV (COL4A3) após receberam as CTm

(Kalluri et al., 2006). Estes resultados em conjunto mostram que a infusão de CTm induzem melhora da função renal.

No presente estudo evidenciamos também uma melhora dos níveis de creatinina nos animais Nx que receberam CTm. Resultados semelhantes foram descritos por dois outros grupos que demonstraram uma marcante melhora da função renal. (Semedo et al., 2009 e Caldas et al., 2009), assim como foi observado melhora dos níveis de creatinina no modelo GN anti-Thy-1 (Kunter et al, 2006; Kunter et al, 2007) e em camundongos com deficiência na cadeia- $\alpha 3$ do colágeno tipo IV (COL4A3) após receberam as CTm (Kalluri et al., 2006). Estes resultados em conjunto mostram que a infusão de CTm induz melhora da função renal.

Com relação à análise histológica, nossos dados demonstraram um efeito protetor das CTm sobre o desenvolvimento da glomeruloesclerose. Pode-se constatar que as CTm reduziram marcadamente a glomeruloesclerose nos ratos Nx após 30 dias. Esses resultados corroboram dados de outros trabalhos que utilizaram CT em modelo de Thy1.1 agravada com nefrectomia (Li et al., 2006; Kunter, et al., 2007) e também em modelo de ablação renal (Semedo et al., 2009). Os possíveis efeitos benéficos da CT não foram totalmente elucidados, mas estas células possuem a habilidade em se diferenciar em outros tipos celulares renais e repovoar as regiões lesionadas durante a injúria. Entretanto, a detecção das CTm na região da lesão tem sido reportada como um fenômeno raro (Morigi et al., 2004; Lin et al., 2003; Kale et al., 2003). Trabalhos recentes demonstram que as CT apresentam a capacidade de migrarem e se integrarem ao tecido renal (Poulson et al., 2001 e Gupta et al., 2002), de se diferenciarem em células

epiteliais renais (Morigi et al., 2004 e Herrera et al., 2004), mas atualmente, o mecanismo considerado mais provável para o efeito protetor das CT parece ser devido à produção local e secreção de hormônios ou fatores de crescimento (efeitos parácrinos) (Bonventre et al., 2004).

Neste estudo, o efeito das CTm na fibrose intersticial foi limitado, diferente do descrito por Semedo e colaboradores, que utilizando o mesmo modelo, constataram uma melhora da fibrose intersticial quando administradas 3 doses de CTm (Semedo et al., 2009). Dois grupos que avaliaram também o efeito das CT em um modelo similar à doença de Alport observaram uma melhora da fibrose intersticial (Ninichuk et al, 2006 e Prodromini et al, 2006). Este efeito antifibrótico das CTm possivelmente não foi observado na análise histológica do presente estudo devido ao curto período do protocolo (30 dias) para um modelo de nefrectomia 5/6. De acordo com trabalhos publicados por Fujihara e colaboradores, apesar da fibrose intersticial já estar presente nos animais com 30 dias de lesão, esse parâmetro só é realmente marcante após 60 dias de lesão tecidual, demonstrando assim um caráter progressivo da doença renal no rim remanescente (Fujihara et al, 1998 e 2000).

Por outro lado, no presente estudo foi observada uma diminuição significativa da expressão de alfa-actina presente nos miofibroblastos, células efetoras da fibrogênese. Apesar de não ter sido observado uma melhora nos índices de área de fibrose intersticial após a inoculação das CTm, foi detectada uma redução significativa do número de miofibroblastos nos animais Nx tanto após 15 dias de lesão quanto com 30 dias.

Considerando que o possível efeito protetor das CT baseia-se na sua influência no microambiente inflamatório, o presente estudo analisou a participação do infiltrado renal de macrófagos, e linfócitos e da atividade proliferativa celular. Quinze dias após a inoculação das CTm nos animais Nx não houve alteração no número de macrófagos e de linfócitos e apenas uma discreta diminuição da presença destes componentes celulares foi observado 30 dias após a inoculação. No entanto, houve uma importante redução da atividade proliferativa após 30 dias. Estes resultados indicam que apesar dos macrófagos e linfócitos estarem presentes, a diminuição de sua atividade proliferativa pode indicar que estas células não estão em atividade. Análise futura dos mediadores inflamatórios, tais como citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas ajudará obter uma maior compreensão destes eventos desencadeados pela inoculação de CTm.

Apesar do trabalho de Smedo e colaboradores não ter analisado o efeito das CT sobre as células inflamatórias, estes pesquisadores analisaram citocinas liberadas por essas células. Foi constatado que as citocinas pró-inflamatórias, tanto sistêmicas quanto *in situ*, estavam diminuídas enquanto que as antiinflamatórias encontravam-se aumentadas (Smedo et al., 2008). Estes resultados dão suporte à hipótese da possibilidade dessas CTm poderem mediar seu próprio efeito reparativo sobre o processo inflamatório seguido tanto da injúria renal aguda (Bonventre et al., 2003) quanto da injúria renal crônica, na tentativa de evitar a progressão do processo inflamatório, bem como o surgimento da fibrose. Os mecanismos pelos quais as CT levam a estas respostas não foram elucidados.

Apesar de resultados animadores, o uso de CT no reparo renal precisa ser melhor investigado. A participação destas células e seu potencial de regeneração podem contribuir para o desenvolvimento de novas intervenções baseadas na aceleração da regeneração renal levando a restauração da função renal.

V. CONCLUSÕES

1. A inoculação das CTdmo na nefropatia crônica, não proporcionou nenhum efeito benéfico nos animais submetidos ao modelo de ablação 5/6;
2. A inoculação das CTm em modelo de ablação 5/6, apresentou um efeito renoprotetor nos animais com doença renal crônica, caracterizada de fato pela diminuição da pressão arterial, proteinúria e albuminúria, melhora na função renal e também uma redução da glomeruloesclerose;
3. O efeito protetor das CTm foi proporcionou a diminuição de miofibroblastos intersticiais e a diminuição da atividade proliferativa celular;
4. A inoculação de CT na região da subcapsula renal pode representar uma promissora via para a oferta de CT, proporcionando assim um maior número de CT disponíveis na lesão.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABBATE M, BROWN D, BONVENTRE JV. Expression of NCAM recapitulates tubulogenic development in kidneys recovering from acute ischemia. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.** 1999, 277:454-63.
- AL-AWQATI Q, OLIVER JA. Stem cells in the kidney. **Kidney Int.** 2002, 61:387-95.
- ANDERSON S, MEYER TW, RENNKE HG, BRENNER BM. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. **J. Clin. Invest.** 1985, 76:612-9.
- ANGLANI F, FORINO M, DEL PRETE D, TOSETTO E, TORREGROSSA R, D'ANGELO A. In search of adult renal stem cells. **J. Cell. Mol. Med.** 2004, 8: 474-87.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS - **Registro Brasileiro de Transplante** ano XII nº2, 2007. Disponível em: <http://www.abto.org.br>
- AUSTIN TW, LAGASSE E. Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. **Mech. Dev.** 2003, 120:131-5.
- BAKSH D, SONG L, TUAN RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **J. Cell. Mol. Med.** 2004, 8:301-16.
- BJORNSON CRR, RIETZE RL, REYNOLDS BA, MAGLI ANGELO MC, VESCOVI L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. **Science** 1999, 283:534-7.
- BLANC KL, PITTENGER M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. **Cytotherapy** 2005, 7:36-45.
- BONVENTRE JV. Molecular response to cytotoxic injury: role of inflammation, MAP kinases, and endoplasmic reticulum stress response. **Semin. Nephrol.** 2003, 23:439-48.
- BONVENTRE JV, ZUK A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? **Kidney Int.** 2004, 66:480-5.

- BRENNER BM. Nephron adaptation to renal injury or ablation. **Am. J. Physiol.** 1985, 249:324-37.
- CALDAS HC, FERNANDES F, GERBI AC, SOUZA AC, BAPTISTA MASF, RAMALHO HJ, KAWASAKI-OYAMA RS, GOLONI-BERTOLLO EC, PAVARINO-BERTELLI EC, BRAILE DM, ABBUD-FILHO M. Effect of Whole Bone Marrow Cell Infusion in the Progression of Experimental Chronic Renal Failure. **Transplantation Proc.** 2008, 40:853-55.
- CANQUE B, CAMUS S, DALLOUL A, KAHN E, YAGELLO M, DEZUTTER-DAMBUYANT C, SCHMITT D, SCHMITT C, GLUCKMAN JC. Characterization of dendritic cell differentiation pathways from cord blood CD34(+)CD7(+)CD45RA(+) hematopoietic progenitor cells. **Blood** 2000, 96: 3748-56.
- CHEN FX, REN WW, YANG Y, SHEN D, ZONG Y, XU S, DUAN Y, QIAN Y, JI Y. Reciprocal effects of conditioned medium on cultured glioma cells and neural stem cells. **J. Clin. Neurosci.** 2009, [Epub ahead of print]
- CHOI KS, SHIN JS, LEE JJ, KIM YS, KIM SB, KIM CW. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2005, 330:1299-305.
- CHOI S, PARK M, KIM J, HWANG S, PARK S, LEE Y. The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of the chronic renal failure. **Stem Cells Dev.** 2009, 18:521-9.
- CUI L, JOHKURA K, TAKEI S, OGIWARA N, SASAKI K. Structural differentiation, proliferation, and association of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in vitro and in their extracardiac tissues. **J. Struct. Biol.** 2007, 158:307-17.
- DOVAT S, FEIG SA. The use of umbilical cord blood stem cells for hematopoietic reconstitution. **West. J. Med.** 1997, 166:342-3.
- EGLITIS MA, MEZEY E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1997, 94:4080-5.
- FERNANDEZ M, SIMON V, HERRERA G, CAO C, DEL FH, MINGUELL JJ. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. **Bone Marrow Transplant.** 1997, 20:265-71.
- FERRARI G, CUSELLA-DE ANGELIS G, COLETTA M, PAOLUCCI E, STORNAIUOLO A, COSSU G, MAVILIO F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science** 1998, 279:1528-30.

- FUJIHARA CK, LIMONGI DM, FALZONE R, GRAUDENZ MS, ZATZ R. Pathogenesis of glomerular sclerosis in subtotally nephrectomized analbuminemic rats. **Am. J. Physiol.** 1991, 261:256-64.
- FUJIHARA CK, MALHEIROS DM, ZATZ R, NORONHA IL. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. **Kidney Int.** 1998, 54:1510-9.
- FUJIHARA CK, VELHO M, MALHEIROS DM, ZATZ R. An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. **Kidney Int.** 2005, 67:1913-24.
- FUJIHARA CK, NORONHA IL, MALHEIROS DMA, ANTUNES G.R, OLIVEIRA IB, ZATZ R. Combined mycophenolate mofetil and losartan therapy arrest established injury in the remnant kidney. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2000, 11:283-290.
- GRACIANO ML, CAVAGLIERI RC, DELLÊ H, DOMINGUEZ WV, CASARINI DE, MALHEIROS DM, NORONHA IL. Intrarenal Renin-Angiotensin system is upregulated in experimental model of progressive renal disease induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2004, 15:1805-15.
- GRIMM PC, NICKERSON P, JEFFERY J, SAVANI RC, GOUGH J, MCKENNA RM, STERN E, RUSH DN. Neointimal and Tubulointerstitial Infiltration by Recipient Mesenchymal Cells in Chronic Renal-Allograft Rejection. **N. Engl. J. Med.** 2001, 345:93-7.
- GUAN K, ROHWEDEL J, WOBUS AM. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. **Cytotechnology** 1999, 30:211-26.
- GUPTA S, VERFAILLIE CM, CHMIELEWSKI D, KIM Y, ROSENBERG ME. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. **Kidney Int.** 2002, 62:1285-90.
- 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, 238:200-10.
- HERRERA MB, BRUNO S, BUTTIGLIERI S, TETTA C, GATTI S, DEREGIBUS MC, BUSSOLATI B, CAMUSSI G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. **Stem Cells** 2006, 24:2840-50.
- HERZOG EL, CHAI L, KRAUSE DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood** 2003, 102:3483-93.

- IANUS A, HOLZ GG, THEISE ND, HUSSAIN MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. **J. Clin. Invest.** 2003;111:843-50.
- IMASAWA T, UTSUNOMIYA Y, KAWAMURA T, ZHONG Y, NAGASAWA R, OKABE M, MARUYAMA N, HOSOYA T, OHNO T. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2001, 12:1401-9.
- ITO T, SUZUKI A, IMAI E, OKABE M, HORI M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2001, 12:2625-35.
- KALE S, KARIHALOO A, CLARK PR, KASHGARIAN M, KRAUSE DS, CANTLEY LG. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. **J. Clin. Invest.** 2003, 112:42-9.
- SUGIMOTO H, MUNDEL TM, SUND M, XIE L, COSGROVE D, KALLURI R. Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. **Proc. Natl. Acad.** 2006, 103:7321-6.
- KAWAMOTO A, GWON HC, IWAGURO H, YAMAGUCHI JI, UCHIDA S, MASUDA H, SILVER M, MA H, KEARNEY M, ISNER JM, ASAHARA T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. **Circulation** 2001, 103:634-7.
- KINOMURA M, KITAMURA S, TANABE K, ET AL: Amelioration of cisplatin-induced acute renal injury by renal progenitor-like cells derived from the adult rat kidney. **Cell. Transplant.** 2008, 17:143-58.
- KRAUSE DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Gene Ther.** 2002, 9:754-8.
- KUNTER U, RONG S, BOOR P, EITNER F, MULLER-NEWEN G, DJURIC Z, ROEYEN CR, KONIECZNY A, OSTENDORF T, VILLA L, MILOVANCEVA-POPOVSKA M, KERJASCHKI D, FLOEGE J. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2007, 18:1754-64.
- KUNTER U, RONG S, DJURIC Z, BOOR P, MULLER-NEWEN YU D, FLOEGE J. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2006, 17:2202-12.
- KUZNETSOV SA, MANKANI MH, GRONTHOS S, SATOMURA K, BIANCO P, ROBEY PG. Circulating skeletal stem cells. **J. Cell. Biol.** 2001, 153:1133-40.

- LI B, MORIOKA T, UCHIYAMA M, OITE T. Bone marrow cell infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat model. **Kidney Int.** 2006, 69:323-30.
- LI J, DEANE JA, CAMPANALE NV, BERTRAM JF, RICARDO SD. The contribution of bone marrow-derived cells to the development of renal interstitial fibrosis. **Stem Cells** 2007, 25:697-06.
- LIN F, CORDES K, LI L, HOOD L, COUSER WG, SHANKLAND SJ, IGARASHI P. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2003, 14:1188-99.
- MASUYA M, DRAKE CJ, FLEMING PA, REILLY CM, ZENG H, HILL WD, STUDDARD AM, HESS DC, OGAWA M. Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. **Blood** 2003, 101:2215-8.
- MEIRELLES LDA S, NARDI NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. **Br. J. Haematol.** 2003, 123:702-11.
- MIAS C, TROUCHE E, SEGUELAS MH, CALCAGNO F, DIGNAT-GEORGE F, SABATIER F, PIERCECCHI-MARTI MD, DANIEL L, BIANCHI P, CALISE D, BOURIN P, PARINI A, CUSSAC D. Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. **Stem Cells** 2008, 26:1749-57.
- MINGUELL JJ, ERICES A, CONGET P. Mesenchymal stem cell. **Exp. Biol. Med.** 2001, 226:507-20.
- MORIGI M, IMBERTI B, ZOJA C, CORNA D, TOMASONI S, ABATE M, ANGIOLETTI RS, BENIGNI A, PERICO N, ALISON M, REMUZZI G. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2004, 15:1794-04.
- MUNDEL P., HEID H.W., MUNDEL T.M., KRUGER M., REISER J., KRIZ W. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. **J. Cell. Biol.** 1997a, 139:193-04.
- MURRY CE, SOONPAA MH, REINECKE H, NAKAJIMA H, NAKAJIMA HO, RUBART M, PASUMARTHI KBS, VIRAG JI, BARTELMEZ SH, POPPA H, BRADFORD G, DOWELL JD, WILLIAMS DA, FIELD LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. **Nature** 2004, 428:664-8.

- NINICHUK V, GROSS O, SEGERER S, HOFFMANN R, RADOMSKA E, BUCHSTALLER A, HUSS R, AKIS N, SCHLÖNDORFF D, ANDERS HJ. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen 4A3-deficient mice. **Kidney Int.** 2006, 70:121-9.
- NYGREN JM, JOVINGE S, BREITBACH M, SÄWÉN P, RÖLL4 W, HESCHELER J, TANEERA J, FLEISCHMANN BK, JACOBSEN SEW. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. **Nat. Med.** 2004, 10: 494-01.
- ODORICO JS, KAUFMAN DS, THOMSON JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells** 2001, 19:193-204.
- OKAMOTO OK, CAMPOS AH. Perspectivas em terapia celular: Célula Tronco. **Einstein** 2004, 02:313-7.
- OLIVER JA, MAAROUF O, CHEEMA FH, MARTENS TP, AL-AWQATI Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. **J. Clin. Invest.** 2004, 114: 795-04.
- ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, LIMANA F, JAKONIUK I, QUAINI F, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2001, 98:10344-9.
- OSLON JL, HOSTETTER TH, RENNKE HG, BRENNER BM, VENKATACHALAM MA. Altered glomerular selectivity and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass. **Kidney Int.** 1982, 22:112-26.
- PERRUCHE S, KLEINCLAUSS F, LIENARD A, ROBINET E, TIBERGHIE P, SAAS P. A single-platform approach using flow cytometry and microbeads to evaluate immune reconstitution in mice after bone marrow transplantation. **J Immunol Methods.** 2004, 294:53-66.
- PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science** 1999, 284:143-7.
- POULSOM R, FORBES SJ, HODIVALA-DILKE K, RYAN E, WYLES S, NAVARATNARASAH S, JEFFERY R, HUNT T, ALISON M, COOK T, PUSEY C, WRIGHT NA. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. **J. Pathol.** 2001, 195:229-35.

- PRODROMIDI EI, POULSOM R, JEFFERY R, ROUFOSSE CA, POLLARD PJ, PUSEY CD, COOK HT. Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. **Stem Cells** 2006, 24:2448-55.
- RICARDO SD, DEANE JA. Adult stem cells in renal injury and repair. **Nephrology** 2005, 10:276-82.
- RIPPON HJ, LANE S, QIN M, ISMAIL NS, WILSON MR, TAKATA M, BISHOP AE. Embryonic stem cells as a source of pulmonary epithelium in vitro and in vivo. **Proc. Am. Thorac. Soc.** 2008, 5:717-22.
- ROMBOUTS WJ, PLOEMACHER RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. **Leukemia** 2003, 17:160-70.
- ROOKMAAKER MB, SMITS AM, TOLBOOM H, VAN 'T WOUT K, MARTENS AC, GOLDSCHMEDING R, JOLES JA, VAN ZONNEVELD AJ, GRONE HJ, RABELINK TJ, VERHAAR MC. Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis. **Am. J. Pathol.** 2003, 163:553-62.
- SCHENA FP, E ABBATTISTA MR. Stem cells: Reparative medicine and nephrology. **J. Nephrol.** 2003, 16:S1-5.
- SEMEDO P, CORREA-COSTA M, CENEDEZE MA, MALHEIROS DM, ANTONIA DOS REIS M, SHIMIZU MH, SEGURO AC, PACHECO-SILVA A, CÂMARA NO. Mesenchymal Stem Cells Attenuate Renal Fibrosis Through Immune Modulation and Remodeling Properties in a Rat Remnant Kidney Model. **Stem Cells** 2009 [Epub ahead of print]
- SEMEDO P, PALASIO CG, OLIVEIRA CD, FEITOZA CQ, GONÇALVES GM, CENEDEZE MA, WANG PM, TEIXEIRA VP, REIS MA, PACHECO-SILVA A, CÂMARA NO. Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury. **Int. Immunopharmacol.** 2009, 9:677-82.
- SEMEDO P, WANG PM, ANDREUCCI TH, CENEDEZE MA, TEIXEIRA VP, REIS MA, PACHECO-SILVA A, CÂMARA NO. Mesenchymal stem cells ameliorate tissue damages triggered by renal ischemia and reperfusion injury. **Transplant. Proc.** 2007, 39:421-3.
- SHICHINOHE H, KURODA S, MARUICHI K, OSANAI T, SUGIYAMA T, CHIBA Y, YAMAGUCHI A, IWASAKI Y. Bone marrow stromal cells and bone marrow-derived mononuclear cells: Which are suitable as cell source of transplantation for mice infarct brain? **Neuropathology** 2009 [Epub ahead of print]

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA - Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2008. Publicado no **J. Bras. Nefrol.** 2008, 30:233-8. Disponível em: <http://www.jbn.org.br>.

SUN JH, TENG GJ, MA ZL, JU SH. In vivo monitoring of magnetically labeled mesenchymal stem cells administered intravascularly in rat acute renal failure. **Swiss. Med. Wkly.** 2008, 12:404-12.

THEISE ND, NIMMAKAYALU M, GARDNER R, ILLEI PB, MORGAN G, TEPERMAN L, HENEGARIU O, KRAUSE DS. Liver from bone marrow in humans. **Hepatology.** 2000, 32:11-6.

UCHIMURA H, MARUMO T, TAKASE O, KAWACHI H, SHIMIZU F, HAYASHI M, SARUTA T, HISHIKAWA K, FUJITA T. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2005, 16:997-1004.

URBICH C, HEESCHEN C, AICHER A, DERNBACH E, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Relevance of Monocytic Features for Neovascularization Capacity of Circulating Endothelial Progenitor Cells. **Circulation** 2003, 108:2511-6.

VERFAILLIE CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends. Cell. Biol.** 2002, 12:502-8.

VERFAILLIE CM. Stem cell plasticity. **Hematology.** 2005, 10:293-6.

WYNN TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J. Pathol.** 2008, 214:199-210.

YOUNG HE, BLACK AC. Adult stem cells. **Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.** 2004, 276:75-102.

YUAN H., TAKEUCHI E., SALANT D.J. Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. **Am. J. Phys. Renal. Fluid & Elect. Phys.** 2002, 282: F585-92.

ZVAIFLER NJ, MARINOVA-MUTAFCHIEVA L, ADAMS G, EDWARDS CJ, MOSS J, BURGER JA. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. **Arthritis Res** 2000, 2:477-88.