

MARCO ANTONIO BORGES LOPES

**Estudo pré-clínico do uso de células-tronco mesenquimais
do líquido amniótico em doença renal crônica induzida por
obstrução unilateral do ureter**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Professor Livre-Docente junto ao
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia
(Disciplina de Obstetrícia)

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lopes, Marco Antonio Borges

Estudo pré-clínico do uso de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico em doença renal crônica induzida por obstrução unilateral do ureter / Marco Antonio Borges Lopes. -- São Paulo, 2010.

Tese(livre-docência)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Obstetrícia e Ginecologia. Disciplina de Obstetrícia.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Líquido amniótico 3.Obstrução ureteral
4.Insuficiência renal crônica 5.Histologia 6.Imunoistoquímica 7.Ratos

USP/FM/DBD-396/10

“O Senhor é meu pastor nada me faltará...”

(Salmo 23)

*À minha querida esposa **Renata** e aos
nossos tesouros **Pedro Henrique e
Beatriz**, alegrias de meu viver.*

*Aos meus **pais** e minha **irmã**, eterna
presença, porto seguro de carinho e
ajuda.*

*Ao querido amigo **Dr. Sérgio Aloísio Duarte**, pela demonstração da verdadeira e pura amizade, pela paciência e fundamental ajuda na elaboração deste estudo, minha eterna gratidão.*

*À minha querida amiga **Rita de Cássia Cavaglieri**, pela fundamental ajuda no trabalho laboratorial e formatação, você é especial, meu carinho e gratidão eterna.*

Deus abençoe todos.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Zugaib**, digníssimo Professor Titular da Clínica Obstétrica do HC-FMUSP, pela confiança e incentivo, por ter aberto as portas desta Casa, acreditando no meu trabalho, proporcionando-me oportunidade única de fazer parte deste Serviço, sobejamente conhecido como de excelência, minha eterna gratidão.

Ao **Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski**, pela amizade, pela parceria nesses anos, minha gratidão.

À **Profa Dra. Irene de Lourdes Noronha**, pelo apoio desde o primeiro minuto, abrindo as portas de seu laboratório, meu profundo carinho.

Ao **Prof. Dr. Victor Bunduki**, pelo apoio e amizade verdadeira.

À **Dra. Rossana P. Francisco**, pela amizade e ajuda.

Ao Dr Adolfo Liao, pela amizade e na ajuda na formatação.

À **Dra. Ana Maria Kondo Igai**, pela amizade e apoio nesses anos de convívio e durante a fase desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Carlos Peraçoli**, pela ajuda na análise dos dados.

À **Dr. Dino Martins Filho**, pela leitura das lâminas do estudo anátomo patológico.

Ao **Dr Leonardo Testagrossa**, pela ajuda na interpretação dos dados.

À **Dra. Percia Bezerra**, pela ajuda na realização da parte experimental.

Aos **colegas da Clínica Obstétrica**, médicos, secretárias e pessoal administrativo, pela colaboração.

Às **pacientes**, que doaram o líquido amniótico para a realização do trabalho e sem os quais este trabalho não se realizaria, minha eterna gratidão.

Aos **colegas e funcionários do Biotério** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, meu muito obrigado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste estudo.

SUMÁRIO

Lista de figuras	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	9
3 MÉTODOS.....	10
3.1 Cálculo amostral.....	10
3.2 Coleta do líquido amniótico	11
3.2.1 Critérios de inclusão das gestantes doadoras	11
3.2.2 Critérios de exclusão das gestantes doadoras	11
3.3 Coleta das amostras de líquido amniótico.....	12
3.4 Isolamento e cultivo das células mesenquimais do líquido amniótico.....	13
3.5 Tripsinização	15
3.6 Contagem celular em hemocítômetro e análise de viabilidade celular.....	16
3.7 Animais utilizados no estudo	17
3.8 Modelo de obstrução unilateral do ureter (OUU).....	17
3.9 Inoculação das CMLA na região sub-capsular renal	18
3.10 Grupos experimentais	18
3.11 Protocolo experimental.....	19
3.11.1 Dosagem da excreção urinária de proteínas	20
3.11.2 Dosagem de creatinina sérica	20
3.11.3 Dosagem de ureia sérica.....	21
3.11.4 Preparo do tecido renal	21
3.11.5 Coloração de tricômio de Masson para análise de fibrose intersticial.....	23
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
5 RESULTADOS.....	26
5.1 Protocolo experimental “in vitro”	26
5.1.1 Preparo das amostras para o isolamento e cultivo celular das CMLA	26
5.1.2 Identificação da formação de colônias celulares	28
5.1.3 Diferenciação celular de CTm em linhagem osteogênica.....	29
5.1.4 Diferenciação celular de CTm em linhagem condrogênica	30
5.1.5 Caracterização fenotípica das CTm.....	31

5.2	Protocolo experimental “in vivo”	32
5.2.1	Modelo de obstrução unilateral do ureter (OUU)	32
5.2.2	Inoculação de CTm na região subcapsular renal.....	34
5.2.3	Volume urinário.....	35
5.2.4	Excreção de proteína urinária.....	36
5.2.5	Dosagem de creatinina sérica	37
5.2.6	Dosagem de ureia sérica	38
5.2.7	Massa renal direita (MRD) e esquerda (MRE).....	39
5.2.8	Fibrose intersticial.....	41
6	DISCUSSÃO	43
7	REFERÊNCIAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotomicrografia realizadas nos diferentes períodos de cultivo das CMLA.....	27
Figura 2 -	Crescimento celular em colônias: A) análise macroscópica das colônias; B) visualização microscópica das colônias	28
Figura 3 -	Diferenciação das CMLA em células da linhagem osteogênica. A) Controle negativo da diferenciação celular B) Coloração vermelho de alizarina para visualização de calcificação; C) Coloração resultante da atividade da fosfatase alcalina produzida pelas células sobre substrato cromogênico	29
Figura 4 -	Diferenciação das CMLA em células da linhagem condrogênica. Microscopia ótica demonstrando condrócitos e lacunas condrocitárias	30
Figura 5 -	Caracterização celular de marcadores de superfície por citometria de fluxo. CTM foram positivas para CD29, CD44, CD90 e CD105 e negativas para CD31, CD34, CD45, e CD117	31
Figura 6 -	Indução da lesão renal através do modelo de OUU	32
Figura 7 -	Visualização macroscópica dos rins nos diferentes grupos: Sham , animal após cirurgia fictícia e mantido por 28 dias; O UU (7 e 28 dias), animal após obstrução do ureter esquerdo	33
Figura 8 -	Inoculação de CT sob a cápsula renal. A região delimitada indica o local exato que as células foram inoculadas	34
Figura 9 -	Volume urinário dos animais nos diferentes grupos	35
Figura 10 -	Proteinúria dos animais nos diferentes grupos	36
Figura 11 -	Creatinina sérica dos animais nos diferentes grupos.....	37
Figura 12 -	Uréia sérica dos animais nos diferentes grupos	38
Figura 13 -	Peso da massa renal tanto direita quanto esquerda dos diferentes grupos	40
Figura 14 -	Fibrose intersticial nos animais após 28 dias de experimento	41

Figura 15 - Fotomicrografia das laminas coradas com Tricômio de Masson para a análise de fibrose intersticial dos grupos Sham, OUU e OUU+CTLA após 28 dias (aumento de 100x).....42

RESUMO

Lopes MAB. *Estudo pré-clínico do uso de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico em doença renal crônica induzido por obstrução unilateral do ureter* [Tese (Livre-Docência)]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2010. 66p.

Objetivo: O presente estudo analisou o efeito reno-protetor de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico humano (CMLA) em modelo experimental de obstrução unilateral do ureter (OUU) através da avaliação da função renal e parâmetros histológicos renais. **Método:** O líquido amniótico (LA) foi coletado por meio de amniocentese em gestantes com aproximadamente 16 a 22 semanas, submetidas ao procedimento para cariótipo fetal. As células do LA foram isoladas pela sua capacidade de aderência ao plástico. A caracterização das CT foi realizada por citometria de fluxo e pela sua capacidade de diferenciação *in vitro*. CMLA (5×10^5 cels) foram inoculadas na região subcapsular renal de 55 ratos Wistar (**OUU** e **Sham** para controle). Os animais foram acompanhados por 7 ou 28 dias, e os seguintes parâmetros foram analisados: volume urinário, proteinúria, a creatinina e uréia sérica e massas renais. Para avaliação histológica do tecido renal utilizou-se a coloração de tricrômio de Masson para quantificar a presença de fibrose intersticial (FI) foi utilizando o método de contagem de pontos. **Resultados:** Animais com OUU e que receberam CMLA na região subcapsular renal após 7 dias, mostrou diminuição da proteinúria e creatinina sérica, porém não foi constatado diferença estatística significativa. Na avaliação após 28 dias foi evidenciada diminuição estatisticamente significativa da proteinúria e tendência a diminuir a creatinina sérica. Com relação à fibrose intersticial animais com OUU apresentaram aumento significativo da FI quando comparado com os animais controle e diminuição da mesma foi observado quando inoculado a CMLA, porém não significativo. **Conclusão:** A inoculação das CMLA apresentou efeito renoprotetor em modelo OUU caracterizada pela diminuição da proteinúria e tendência a diminuir a creatinina sérica. Entretanto, não foi evidenciado na avaliação histológica melhora da fibrose intersticial.

Descritores: 1. Células-tronco 2. Líquido amniótico 3. Obstrução Ureteral 4. Insuficiência renal crônica 5. Histologia 6. Imunoistoquímica 7. Ratos

SUMMARY

Lopes MAB. *Preclinical study using amniotic fluid mesenchymal stem cells in chronic renal failure induced by unilateral ureteral obstruction* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2010. 66p.

Purpose: The present study examined the renoprotective effect of the amniotic fluid mesenchymal stem cells (AFSC) in an experimental model of unilateral ureteral obstruction (UUO) by kidney function and histological parameters.

Material and Methods: Amniotic fluid was collected from pregnancies undergoing fetal karyotyping between 16 and 22 weeks gestation. The AFSC were isolated by adhere to plastic. AFSC characterization was carried out by flow cytometry and differentiation in culture. AFSC (5×10^5 cells) were inoculated into the subcapsular region of the 55 Wistar kidneys (UUO and Sham controls). Follow up was performed until the 7 or the 28th day, the following parameters were examined: urinary output, proteinuria, serum creatinine, urea and renal mass. Masson's Trichrome staining was used to quantify interstitial fibrosis by computer program counting spots with fibrosis. **Results:** UUO with AFSC cases examined on the 7th day showed lower proteinuria and serum creatinine (not statistically significant). Evaluation on the 28th day showed a significant reduction in proteinuria and a trend to diminished creatinine levels. UUO animals showed significant increase in interstitial fibrosis compared to controls. A reduction in interstitial fibrosis was observed when AFSC were inoculated (not statistically significant). **Conclusions:** AFSC inoculation was associated with renoprotective effect in UUO animal models demonstrated by reduced proteinuria and a trend to interstitial fibrosis reduction. However interstitial fibrosis improvement was not demonstrated on histology.

Descriptors: 1. Stem cells 2. Amniotic Fluid 3. Ureteral Obstruction 4. Chronic renal failure 5. Histology 6. Immunohistochemistry 7. Rat

1 – INTRODUÇÃO

Erros de desenvolvimento podem ocorrer na constante multiplicação e diferenciação celular que resultará no organismo adulto.

A incidência de anormalidade estrutural detectada pela ultrasonografia antenatal é por volta de 1%¹. Destas aproximadamente 20% envolvem o trato genito-urinário². No entanto, estima-se ao redor de 3% da população seja portadora de alguma anormalidade dos rins e dos ureteres³.

As malformações do sistema nefro-urológico podem ser divididas em dois grandes grupos: anormalidades não obstrutivas e obstrutivas. Esta separação se impõe devido à grande importância destas últimas no período perinatal (estima-se que até 2% da população pediátrica, submetida a autópsia, apresenta algum tipo de lesão obstrutiva do trato urinário)^{4,5}.

No setor de Medicina Fetal da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo durante os períodos de 2000 a 2003 foram diagnosticados 241 casos de anormalidades nefro-urológicas, sendo que 60% destas corresponderam a uropatia obstrutiva e 40% a uropatia não obstrutiva⁶.

As anomalias das vias excretoras urinárias constituem um grupo heterogêneo de agressões obstrutivas em diferentes níveis, graus, épocas de aparecimento e natureza de lesão. Elas compartilham, no entanto, um mecanismo fisiopatológico muitas vezes comum, promovendo uma

obstrução que se transmite ao rim, determinando o seu comprometimento funcional.

Nos casos de malformações das vias urinárias com dilatação do sistema coletor e suspeição de obstrução, ela pode ocorrer em três níveis diferentes: na porção proximal do ureter (obstrução pelo-calicial), na porção distal do ureter, próximo à bexiga (obstrução uretero-vesical) e na uretra. As duas primeiras irão acarretar dilatações unilaterais do lado acometido, enquanto a obstrução ao nível da uretra ocasiona uma dilatação de vias urinárias que é bilateral na maioria das vezes (a manifestação com dilatação unilateral existe, porém é rara, e gera uma proteção da função renal no rim não-dilatado contra-lateral)⁷. Nos casos de obstrução alta, a função renal global do feto é sempre boa, pois o outro rim funciona normalmente (exceto nos casos em que há acometimento bilateral ou agenesia renal contra-lateral). Nos casos de obstrução baixa ou acometimento bilateral, é importante a avaliação da função renal. Frequentemente, quando o acometimento é importante, observa-se oligoâmnio ou anâmnio. Nesses casos, além de insuficiência renal, esses fetos apresentam hipoplasia pulmonar, com insuficiência respiratória após o nascimento^{7,8,9,10}.

O estudo anátomo-patológico renal de fetos que apresentam obstrução de vias urinárias mostra lesões características: o parênquima apresenta lesões micro-císticas associadas à hipoplasia cortical, e dilatação dos túbulos coletores. Além disso, os glomérulos encontram-se esclerosados e há diminuição do índice de formação de novos glomérulos. Ocorre fibrose intersticial cortical, e a diferenciação do blastema metanéfrico se altera, as

células se diferenciam preferencialmente em miofibroblasto, ao invés de seguirem sua diferenciação normal em tecido glomerular^{11,4,12,13,14,15}. Como sabemos, trata-se de um processo fisiopatológico que afeta fases críticas no desenvolvimento embriológico renal e, portanto, resulta em alteração definitiva da estrutura renal.

As doenças renais crônicas evoluem de forma semelhante, com perda progressiva da função renal, evoluindo para um processo de fibrose e cicatrização, que resulta em perda absoluta da função do órgão, denominada insuficiência renal crônica terminal. O quadro histológico caracteriza-se por glomérulo-esclerose, atrofia tubular e fibrose intersticial. Não existe tratamento específico para a doença renal crônica. Um dos maiores desafios no tratamento da insuficiência renal crônica é conseguir interromper o processo de progressão ou, pelo menos, prolongar ao máximo o tempo de evolução para a perda funcional total. Nas fases avançadas, a única alternativa de tratamento é a terapia substitutiva, com diálise e/ou transplante renal.

Dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia mostram que cerca de 75.000 pacientes estão em diálise atualmente no Brasil¹⁶, o que corresponde à prevalência de 330 pacientes por milhão de habitantes, com uma taxa de crescimento de 8% ao ano. O Brasil realiza cerca de 3.000 transplantes renais por ano. 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 nesta área de pesquisa básica e pesquisa pré-clínica, não apenas pela relevância indiscutível do ponto de vista clínico, mas também em termos de política econômica de saúde.

O emprego de modelos experimentais permite uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão das doenças renais e, desta forma, possibilita a investigação de estratégias terapêuticas que interfiram na progressão da doença renal crônica, como por exemplo, o uso de anti-hipertensivos, particularmente o bloqueio da angiotensina II (através de inibidores da enzima conversora ou bloqueadores do receptor de angiotensina), anti-inflamatórios/imunossupressores (micofenolato mofetil), além de outras, têm sido intensamente investigadas, porém com sucesso relativo¹⁷. Embora possamos utilizar vários modelos animais, o modelo experimental de obstrução unilateral do ureter em ratos produz alteração histológica como a fibrose intersticial progressiva, evento comum da insuficiência renal crônica, servindo para o propósito do estudo a que nos propomos¹⁸,

A sequência de eventos que segue a ligadura cirúrgica unilateral do ureter leva a uma redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular em 24h¹⁹. Após alguns dias, segue-se hidronefrose, infiltrado inflamatório intersticial (macrófagos), e apoptose e necrose das células tubulares, causada por isquemia, hipóxia, injúria oxidativa²⁰. A hidronefrose que se segue após a obstrução unilateral do ureter em ratos leva a perda do parênquima renal em uma a duas semanas, ocorrendo uma fibrose mais intensa em ratos recém-nascidos que em adultos^{18,21,22}. Além disso, estudos anteriores demonstram diferença na ação de inibidores da angiotensina II

nos ratos adultos com obstrução unilateral do ureter em relação aos neonatos. Ocorre melhora da fibrose e função renal no primeiro e exacerbação da lesão no segundo grupo^{23,17}.

O uso de células, a mesma ferramenta empregada pela natureza, na formação, manutenção e reparo do tecido humano, oferece vantagens óbvias. Neste contexto, destaca-se a possibilidade do emprego terapêutico de células-tronco (CT) na doença renal crônica progressiva.

Nos últimos anos, alguns estudos identificam presença de um nicho de células-tronco em tecido renal. Em 2004, Oliver e colaboradores, assumindo que estas células apresentam ciclo celular lento, administram nucleosídeo bromodeoxiuridina (BrdU) em filhotes de ratos para localizar células incorporadas com BrdU. As células incorporadas com BrdU foram localizadas na papila renal. Além disso, estes autores observam que após esses animais serem submetidos à isquemia-reperfusão, as células localizadas na região papilar migram em direção à região isquêmica, sugerindo que o nicho de CT renal situa-se na região da papila renal²⁴. Outros autores observam a presença de CT em sítios peri-tubulares e na região S3 do túbulo proximal, sendo esta região possivelmente outra fonte de CT residentes²⁵.

As células-tronco embrionárias podem crescer indefinidamente em cultura apropriada, geram diferentes tipos celulares e permitem manipulação genética mais fácil. Por outro lado, sua utilização apresenta questionamentos éticos quanto a sua obtenção e seu potencial de desenvolvimento de tumores²⁶.

Recentes estudos sugerem a participação de células-tronco adultas como fonte para a regeneração tecidual, com capacidade de formar componentes funcionais de outros tecidos tais como, coração, pulmão, cérebro, músculo esquelético e endotélio vascular, já que estas células possuem um grande potencial de diferenciação em múltiplas linhagens celulares^{27,28,29,30,31}.

Dentre as células-tronco adultas, a utilização de células do líquido amniótico vem despertando grande interesse. O líquido amniótico é fonte de células fetais, podendo ser obtido precocemente na gestação. Resultados animadores quanto à alta capacidade proliferativa, de se diferenciar em qualquer célula e principalmente de expressar marcadores embrionários *in vitro*³² vêm despertando interesse de pesquisadores em aplicá-las em modelos experimentais. Porém, existe ainda necessidade de experimentação em modelos de rim adulto, para melhor caracterizar o papel dessas células em cenário já definido, para então estudar o seu papel em um rim em formação, quando variáveis fisiológicas e patológicas amplificam o número de variáveis.

Recentes estudos *in vivo* demonstram que as células-tronco mesenquimais de líquido amniótico (CMLA) transplantadas em modelo experimental de isquemia/reperfusão cerebral, sobrevivem e migram até a região da lesão além de se diferenciar em células neuronais^{33,34}. Outro estudo relata um efeito regenerativo ao inocular as CMLA em ratos com lesão no nervo ciático, através da liberação de fatores neurotróficos que aumentam a sobrevivência do neurônio e promovem uma regeneração do nervo

ciático³⁵. Em infarto agudo do miocárdio, CMLA autólogas são aplicadas no local de isquemia, com mudança no padrão de expressão gênica das células inoculadas, com perda dos marcadores de indiferenciação e com permanência dos marcadores de músculos lisos e endoteliais. Não ocorre expressão do marcador de cardiomiócitos, a troponina I. Isso demonstra que as CMLA trans-diferenciam-se em células vasculares, mas não em cardiomiócitos³⁶.

Em aplicações nefro-urológicas, utilizadas em lesão de bexiga urinária, observa-se hipertrofia da musculatura restante após infusão de CMLA³⁷. Essas células, em co-cultura com rins fetais murinos, incorporam-se às estruturas primordiais renais, além de expressar marcadores específicos de células renais, podem apresentar papel na regeneração renal³⁸.

Outro aspecto a se analisar é a via de inoculação das CMLA visando alcançar e atuar no órgão-alvo (*"homing"*). Pode-se utilizar em modelo animal (ratos), inoculação de células-tronco via veia caudal e intra-arterial, porém uma outra via parece ser mais adequada em prover células-tronco em número expressivo no órgão alvo, como demonstrado por Kinomura e colaboradores³⁹. Utilizando um modelo de injúria renal tubular aguda com inoculação de células progenitoras de ratos, tanto via intra-arterial como sub-capsular renal, eles observam que a inoculação sub-capsular produziu melhora significativa do escore para apoptose na lesão renal em comparação ao grupo que recebeu células-tronco via intra-arterial³⁹. Uma possível explicação seria que a inoculação das células-tronco via intra-

arterial ou endovenosa dependem do fluxo sanguíneo e, portanto, teriam uma passagem rápida pelo órgão alvo. Aparentemente a inoculação subcapsular permite que um número maior de células atinja e permaneça na região da lesão, já que estas células permanecem em contato direto com o órgão alvo ³⁹.

Um possível emprego terapêutico das CMLA na tentativa de impedir a progressão da doença renal poderá ser uma alternativa importante a ser investigada em tratamentos de doenças renais. Em medicina fetal, a conduta nos casos de obstrução unilateral das vias urinárias, com comprometimento renal unilateral, consiste no acompanhamento do rim sadio. Se porventura a inoculação de células-tronco demonstrar reno-proteção ao rim hidronefrótico em modelo animal, deve-se imaginar discussão sobre conduta ativa no rim afetado, se imaginarmos a correlação modelo-animal/humano⁴⁰.

Portanto, com o objetivo de avaliar o papel das células-tronco derivadas de líquido amniótico de pacientes aproximadamente na 20^o semana em animais com doença renal crônica, utilizamos o modelo de obstrução unilateral do ureter (OUU) e a inoculação das CMLA diretamente no tecido renal, ou seja na região subcapsular renal, sendo inoculadas no momento da lesão (tratamento precoce).

Para caracterizar a gravidade da doença renal foram monitorizados os seguintes parâmetros: proteinúria, creatinina sérica, ureia, fração de excreção de sódio e potássio bem como a histologia renal.

2 – OBJETIVOS

O objetivo do presente projeto foi estudar o efeito reno-protetor de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico (CMLA) através da avaliação da função renal e parâmetros histológicos renais, em modelo experimental de doença renal progressiva (modelo de obstrução unilateral do ureter), inoculadas em região subcapsular renal.

3 – MÉTODOS

O presente estudo experimental utilizou modelo animal de obstrução alta de vias urinárias, utilizando ratos Wistar machos com obstrução unilateral de ureter, com modelo de terapia celular por inoculação subcapsular imediata de células-tronco mesenquimais de líquido amniótico, obtidas de gestantes da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da FMUSP, com indicação para avaliação de cariótipo fetal.

O Estudo foi conduzido de acordo com as normas exigidas pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e o mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade sob o nº 138/10.

3.1 CÁLCULO AMOSTRAL

Tendo em vista o ineditismo do experimento, o mesmo foi conduzido baseado em estudo anterior da literatura, conduzido com células-tronco mesenquimais de medula óssea inoculadas no mesmo modelo animal⁴¹. Utilizamos no total 60 espécimes, sendo dividido em oito grupos.

A amostra final em virtude da mortalidade inesperada totalizou de 55 animais divididos em: **GRUPO DE 7 DIAS** em Sham (n=4); Sham+CMLA (n=6); OUU (n= 5); OUU+CMLA (n=8) e em **GRUPO DE 28 DIAS** Sham (n=5); Sham+CMLA (n=6); OUU (n= 5); OUU+CMLA (n=6).

3.2 COLETA DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

3.2.1 Critérios de inclusão das gestantes doadoras

No estudo, foram incluídas gestantes que preenchiam os seguintes critérios:

- gestação sem intercorrências clínicas ou obstétricas, com indicação para investigação de cariótipo fetal, por idade materna avançada;
- idade gestacional entre 16 e 22 semanas;
- ausência de defeito estrutural fetal observado em ultrassonografia morfológica;
- concordância em participar do estudo, assinando termo de consentimento informado.

3.2.2 Critérios de exclusão das gestantes doadoras

A exclusão estava prevista nas seguintes condições:

- desistência em participar do projeto;
- ocorrência de acidente durante a amniocentese, ocasionando contaminação do líquido amniótico com sangue materno;
- cariótipo fetal alterado;
- malformação estrutural constatada ao nascimento;
- falha de expansão das células, em cultura; e
- contaminação bacteriana e/ou fúngica da cultura celular.

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

As amostras de líquido amniótico foram usadas e obtidas por amniocentese de gestantes que preenchem os critérios para inclusão no projeto aprovado pela CAPESQ em 09/08/2007, registrado sob o número 0414/2007.

A obtenção de células do líquido amniótico foi realizada no ambulatório do Setor de Medicina Fetal da Clínica Obstétrica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por meio de amniocentese clássica ou de segundo trimestre, realizada entre 16 e 22 semanas de idade gestacional, confirmada por ultrassonografia de primeiro trimestre, indicada por idade materna superior a 35 anos.

Após a assinatura do consentimento informado, esclarecendo a finalidade, os riscos e o motivo do procedimento, a paciente permaneceu em decúbito dorsal horizontal. Inicialmente, foi realizada uma ultrassonografia a fim de confirmar-se idade gestacional, localização da placenta, volume de líquido amniótico, morfologia e vitalidade fetal que foi feita após assepsia do abdome com iodopovidona tópica e cobertura do transdutor com plástico estéril. Não se utilizou anestesia local para o procedimento.

Para a realização da punção, foram usadas agulha calibre 20 ou 22 *gauge* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), com 9 cm de comprimento e seringa descartável de 20 mL.

A punção sempre foi guiada pela ultra-sonografia, preferencialmente sem transfixar a placenta. No caso de impossibilidade, foi realizada punção trans-placentária. A agulha foi inserida através da parede abdominal, em

seguida, pela parede uterina, atingindo a cavidade amniótica, sempre observando seu trajeto à ultra-sonografia, procurando um grande bolsão, distante do feto, preservando-o. Retirado então o guia da agulha, conectou-se a seringa (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e aspirou-se pequena quantidade de líquido amniótico. Descartou-se a primeira amostra, pelo risco de contaminação com células maternas. A segunda amostra, então, foi utilizada para o estudo. O volume aspirado, normalmente de 30 mL, foi dividido em duas amostras, uma delas (20 mL), seguiu para cariotipagem fetal e a outra para o estudo (10mL). Finda a aspiração, a agulha e seringa foram retiradas conjuntamente. Pela ultrassonografia, foi avaliado, o trajeto da agulha e observadas a presença ou ausência de sangramento no mesmo e a vitalidade do feto.

Após permanecer em repouso durante alguns minutos, a paciente foi orientada a respeito de sintomas pós-procedimentos, tais como, dor, febre, perda de líquido ou sangramento e orientada a retornar às suas atividades rotineiras. Não se fez necessária a profilaxia da aloimunização ao fator Rh, com administração de 300µg de imunoglobulina anti-D, pelo fato das pacientes selecionadas apresentarem fator Rh positivo.

3.4 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

As amostras coletadas pela amniocentese, no projeto anterior, de onde se originaram as células utilizados no presente, foram transportadas imediatamente para o laboratório, transferidas para tubos cônicos de polipropileno de 15 mL (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e

centrifugadas em 1800 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o precipitado foi removido e re-suspenso em tubo cônico de polipropileno (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo 2 mL do meio α -MEM (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). O total de células foi contado em hemocítmetro (vide descrição abaixo). Uma fração de 125.000 células de cada amostra foi re-suspensa em frasco de cultura (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) de 175 cm². As amostras continham 25 mL de meio α -MEM contendo 100 UI/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Penicillin – Streptomycin – Gibco Division, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum Standard – Gibco Division, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), previamente inativado a 56°C por 45 minutos. Essas garrafas permaneceram em ambiente de estufa de cultura, a 37°C, com 95% de umidade, e CO₂ a 5%. O cultivo celular foi monitorado sob microscopia ótica invertida e o meio de cultura foi trocado duas vezes por semana, utilizando-se o mesmo meio suplementado descrito.

As CMLA foram isoladas das outras presentes no líquido amniótico, pela sua capacidade de aderência ao plástico e de expansão em meio de cultivo com altas concentrações de aminoácidos e proteínas, sem uso de outros fatores de crescimento além daqueles presentes no soro. A cultura foi mantida até se obter confluência celular de 70%, coletadas, após tripsinização, para inoculação nos modelos animais.

3.5 TRIPSINIZAÇÃO

As CMLA secretam uma matriz extracelular e proteínas de ligação que permitem sua adesão à superfície de crescimento. É necessário um tratamento prévio com enzima proteolítica, a tripsina, por exemplo, para que as células percam sua adesão. Para que isso ocorra, é preciso que o SFB, o cálcio e o magnésio do meio sejam removidos, de forma a afrouxar a ligação célula – célula e permitir o acesso da enzima proteolítica à superfície das células. Para tanto, o frasco de cultivo foi lavado com 10 mL de PBS 1X por duas vezes, após a remoção de todo o meio. A seguir, a solução de versene-tripsina (ATV) (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil) foi acrescentada, no volume de 5 mL para os frascos de 175 cm² (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), com o objetivo de recobrir toda a monocamada de células. A amostra, então, foi incubada a 37°C por 1 minuto e após, as células foram visualizadas ao microscópio de contraste de fase para confirmação de perda de adesão. A tripsina foi inativada com 10 mL de meio α -MEM 20% SFB. Estas células foram transferidas para um tubo de polipropileno (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) previamente identificado, centrifugadas por 10 minutos a 1800 rpm. Após o descarte do sobrenadante, ao botão celular homogeneizado foram acrescentados 2 mL do meio de cultivo. Uma amostra destas células foi separada para contagem. Após a determinação do número de células coletadas, alíquotas foram separadas e destinadas para uso nos ensaios previstos.

3.6 CONTAGEM CELULAR EM HEMOCITÔMETRO E ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

A contagem das células para posteriormente inoculação nos animais de estudo, foi realizado utilizando um hemocitômetro, também, conhecido como câmara de Neubauer, sendo este Um tipo especial de lâmina de vidro utilizado em microscópio, elaborada com o fim de contagem celular. Essa lamina é dividida em quadrantes de área definida, sobre o qual a suspensão celular é distribuída e diluída em volume conhecido. Pela contagem de células nesse volume, aplica-se cálculo apropriado para aferir a concentração de células da amostra.

As amostras de suspensão celular foram diluídas em tubos cônicos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), de 15 mL, em meio α -MEM (do inglês, *minimum essential medium eagle – alfa modification*) (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) suplementadas com 20% de SFB (soro fetal bovino). A seguir, foi adicionada solução de azul de Trypan 0,4% (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) em volume conhecido para posterior análise da concentração e viabilidade celular. Cada amostra foi homogeneizada e desta, 10 μ L foram colocados no hemocitômetro. As células não coradas, presentes nos quatro quadrantes da câmara, foram contadas em microscópio ótico Olympus2 (Olympus CBA, Tokyo, Japan). A concentração das células foi determinada pela divisão por quatro do número total de células contadas, multiplicado pelo fator de diluição da solução de azul de Trypan 0,4% e pelo fator de correção (10.000).

A viabilidade celular da amostra foi analisada pela contagem do número de células não coradas (viáveis) em relação às coradas (não

viáveis), expressas em porcentagem. Esta análise é possível pela propriedade das células viáveis de não serem permeáveis ao azul de Trypan.

3.7 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO

Foram utilizados, ratos Wistar machos, com aproximadamente 45 dias de vida, obtidos de colônia mantida pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas comportando até 5 ratos, mantidos à temperatura de 22 C°, num ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com ração padrão, obtida comercialmente da empresa NUVITAL e água *ad libitum*.

3.8 MODELO DE OBSTRUÇÃO UNILATERAL DO URETER (OUU)

O animal foi anestesiado com a associação de Ketamina + Xilazina. (70mg/Kg), submetido à tricotomia na região abdominal e assepsia local com álcool iodado. A cavidade abdominal foi aberta com a tesoura romba. Em seguida, as vísceras foram afastadas para a dissecação do ureter esquerdo. O mesmo foi obstruído com fio de nylon 6-0 em dois pontos do ureter. As vísceras e a cavidade abdominal foram lavadas com solução fisiológica, e em seguida preenchida com 3 mL de solução fisiológica. A sutura da musculatura abdominal foi realizada com fio cromado 4-0, utilizando ponto separado simples e a da pele com fio de algodão 4-0.

O animal em seguida foi transferido para uma gaiola de plástico forrada com maravalha, sob o aquecimento de uma lâmpada incandescente.

O animal permaneceu nesta gaiola por uma noite, no biotério, com comida e água.

3.9 INOCULAÇÃO DAS CMLA NA REGIÃO SUB-CAPSULAR RENAL

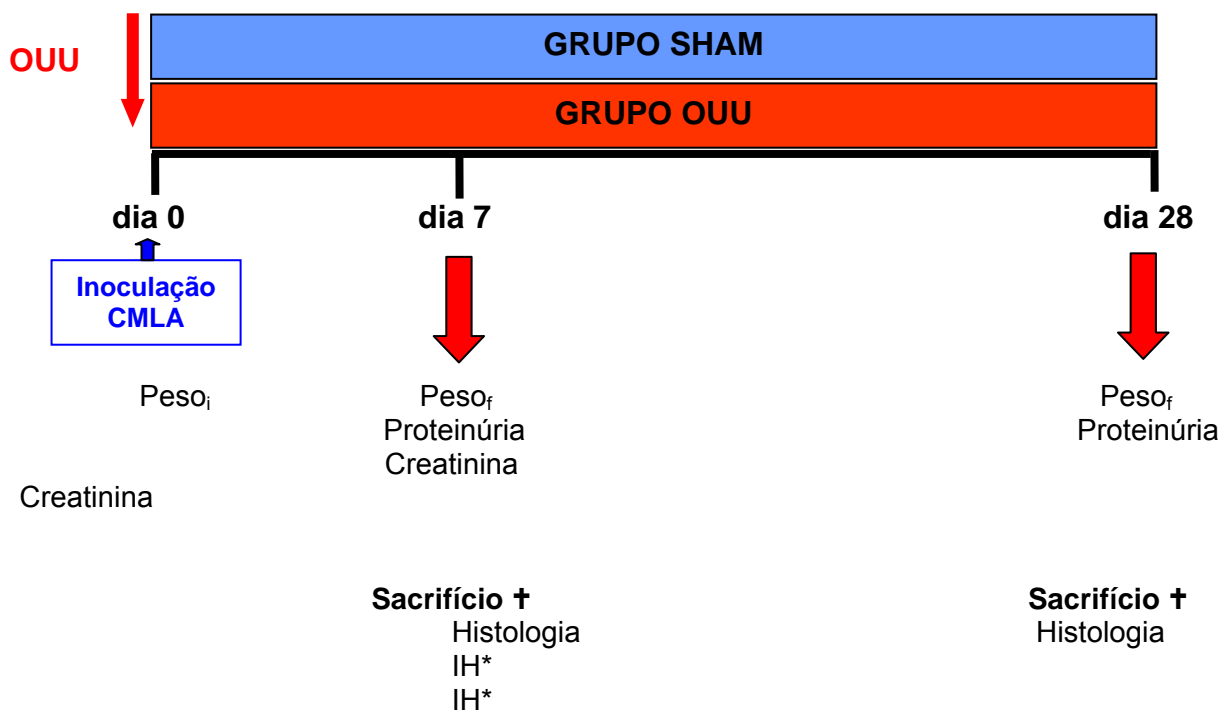
O animal foi anestesiado com a associação de Ketamina + Xilazina. (70mg/Kg) e submetido à tricotomia na região lombar esquerda, assepsia local com álcool iodado, seguido de lombotomia esquerda. O rim esquerdo foi acessado e um corte de 5 mm foi realizado na cápsula renal. A inoculação das CMLA foi realizada com o auxílio de um capilar de plástico estéril colocado sob a cápsula renal, seguido da injeção das CMLA com o auxílio de um micro-injetor. Ele consiste em uma seringa de vidro de 1mL acoplada a uma escala de 0,001mm. O número de CMLA inoculada na região sub-capsular foi de 5×10^5 células em 10 μ L de PBS. Após a infusão das CMLA, a cápsula renal foi cauterizada com bisturi elétrico. A incisão da lombotomia foi suturada com fio de seda 5,0. Após a realização da cirurgia os animais foram mantidos e acompanhados na sala pós-cirúrgica.

3.10 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais (7 e 28 dias) e sub-divididos em 4 grupos, da seguinte forma:

- OOU** Ratos Wistar submetidos a OOU para o desenvolvimento da doença renal crônica;
- OOU+CMLA** Ratos Wistar submetidos à OOU e que receberam CMLA no momento da obstrução;
- Sham** Ratos Wistar submetidos à cirurgia fictícia, sem doença renal (controle do efeito da cirurgia);
- Sham+CMLA** Ratos Wistar submetidos à cirurgia fictícia, sem doença renal e que receberam CMLA no momento da OOU.

3.11 PROTOCOLO EXPERIMENTAL



* IH: Imuno-histoquímica

3.11.1. DOSAGEM DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE PROTEÍNAS

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

3.11.2. DOSAGEM DE CREATININA SÉRICA

A dosagem de creatinina sérica das amostras de sangue coletadas foi realizada através de kit comercial Labtest (Labtest, Lagoa Santa, Brasil), baseado na reação de Jaffé-picrato alcalino. Resumidamente, a creatinina reage com a solução de picrato em meio alcalino, formando a 37°C um complexo de cor amarela medido no comprimento de onda de 510 nm. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo a cor derivada dos cromogênios, que também pode ser medida. A diferença entre as duas leituras fornece o valor real da creatinina, em mg/mL.

3.11.3. DOSAGEM DE UREIA SÉRICA

A dosagem de ureia sérica das amostras de sangue coletadas foi realizada através de kit comercial Labtest (Labtest, Lagoa Santa, Brasil). As amostras para a dosagem de ureia foram previamente descongeladas e centrifugadas durante 20 minutos a 7.000 rpm. Em seguida, as amostras foram incubadas no Banho Maria à 100° C por 10 minutos juntos com o reagente de cor e o reagente ácido. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 530nm.

O resultado obtido foi aplicado na seguinte formula:

$$(Amostra/Padrão) \times 50 = \text{Valor da Ureia em mg/dl}$$

3.11.4. PREPARO DO TECIDO RENAL

No fim de cada período (7 dias e 28 dias), os animais foram anestesiados com ketamina + xilazina (70 mg/Kg), por via intra-peritoneal, para a realização de nefrectomia esquerda.

Após a análise da massa, o rim esquerdo de cada animal foi seccionado em três fragmentos. Dois fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido e destinados à fluorescência. Para congelamento do tecido foi utilizado o meio de inclusão Jung Tissue Freezing Medium (Leica Products, Bonn, Germany), e adicionado nitrogênio líquido para armazenamento a - 80°C. Foi utilizado criostato CM3000 Reichert-Jung (Leica Products, Bonn, Germany) para cortes de 5µm de espessura. Após os cortes, as lâminas foram secas e fixadas em acetona (Merck, Darmstadt, Germany) durante 7 minutos. Após a fixação as lâminas foram conservadas

a - 80°C até visualização em microscópio de fluorescência. O fragmento restante, destinado à análise histológica e imuno-histoquímica, foi fixado em solução Duboscq-Brazil por 45 minutos. 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) por 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), seguido 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 parafinado 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 µm, 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 des-parafinização, 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.

3.11.5 COLORAÇÃO DE TRICÔMIO DE MASSON PARA ANÁLISE DE FIBROSE INTERSTICIAL

A análise da área da fibrose intersticial foi realizada através de lâminas coradas pela técnica de Tricômio de Masson. A coloração em azul, é encontrada de forma constitutiva no tecido conjuntivo dos vasos em todos os animais e por isso não foi contabilizado na presente análise.

A análise da fibrose intersticial foi realizada somente nos animais no 28º dia, uma vez que este marcador é utilizado para avaliar a cronicidade dos casos. Após a des-parafinização, as lâminas foram imersas em uma solução de hematoxilina de Harris por 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 Permout (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Para a avaliação do grau de expansão do interstício renal, 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 em 50 campos, com aumento de 400x. A média foi expressa em pontos por mm^2 .

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi baseada na comparação de grupos. Inicialmente as diversas variáveis foram testadas para normalidade. Caso apresentem distribuição normal foi aplicado o teste ANOVA, com pós-teste de Tukey, caso ocorra diferença estatística. Caso contrário foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para medianas, com pós-teste de Dunn. Na eventualidade de se compararem apenas 2 grupos, foi utilizado o teste t de Student para amostras não pareadas, ou o teste de Mann-Whitney, quando os dados forem não paramétricos. Os resultados foram apresentados como média e erro padrão, e foram considerados estatisticamente significativos quando o p for menor que 0,05.

Para efetuar esses cálculos foi utilizado o programa GraphPad Prism, versão 4.03.

5. RESULTADOS

5.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL “IN VITRO”

5.1.1. Preparo das amostras para o isolamento e cultivo celular das CMLA

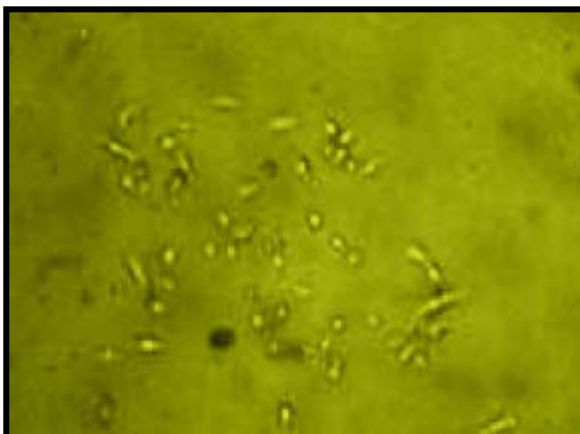
Conforme padronizado no Laboratório de Hematologia e Frações, as células-tronco mesenquimais (CTm) foram obtidas do líquido amniótico de pacientes na 16 a 20 semana gestação. Esta padronização foi reproduzida com sucesso, principalmente por ser uma técnica bem estabelecida e simples de ser realizada. Para cada 5 mL de líquido amniótico foi obtido aproximadamente 120 mil células ($1,2 \times 10^5$). Para o critério de contagem foram desconsideradas possíveis presenças de hemácias e células.

As células isoladas apresentaram adesão às placas de cultivo depois de serem mantidas por 24 horas em meio de cultura e em ambiente apropriado e depois de 72 horas de incubação as células não aderentes foram removidas. Após 7 dias de cultura pode-se observar presença de células com morfologia fibroblastóides. Com 10 dias de cultivo as células apresentaram uma alta atividade proliferativa e formação de colônias celulares conhecidas como Unidade Formadoras de Colônias – *fibroblast-like colonies*, atingindo um plato de crescimento celular após o 15 dia (Figura1).

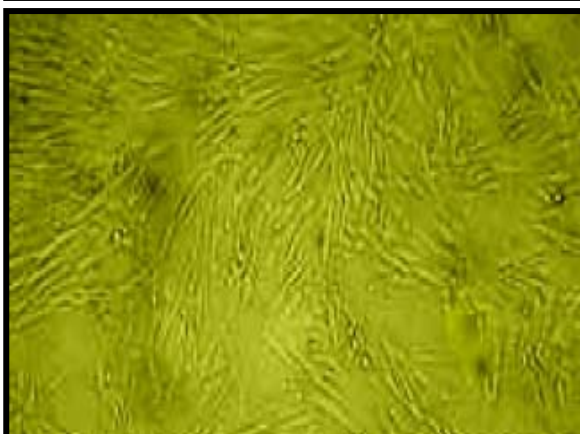
24 horas



7° dia



10° dia



17° dia

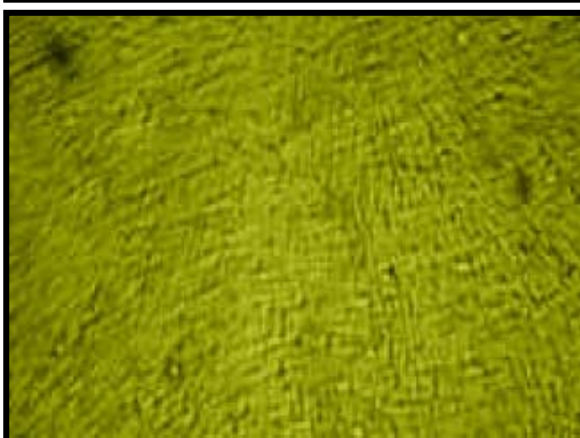


Figura 1 - Fotomicrografia realizadas nos diferentes períodos de cultivo das CMLA

5.1.2. Identificação da formação de colônias celulares

As CTm isoladas do líquido formaram uma população celular heterogênea, com uma morfologia predominantemente fusiforme e com capacidade de formar colônias semelhantes às de fibroblastos (*fibroblast-like colonies*) (Figura 2).

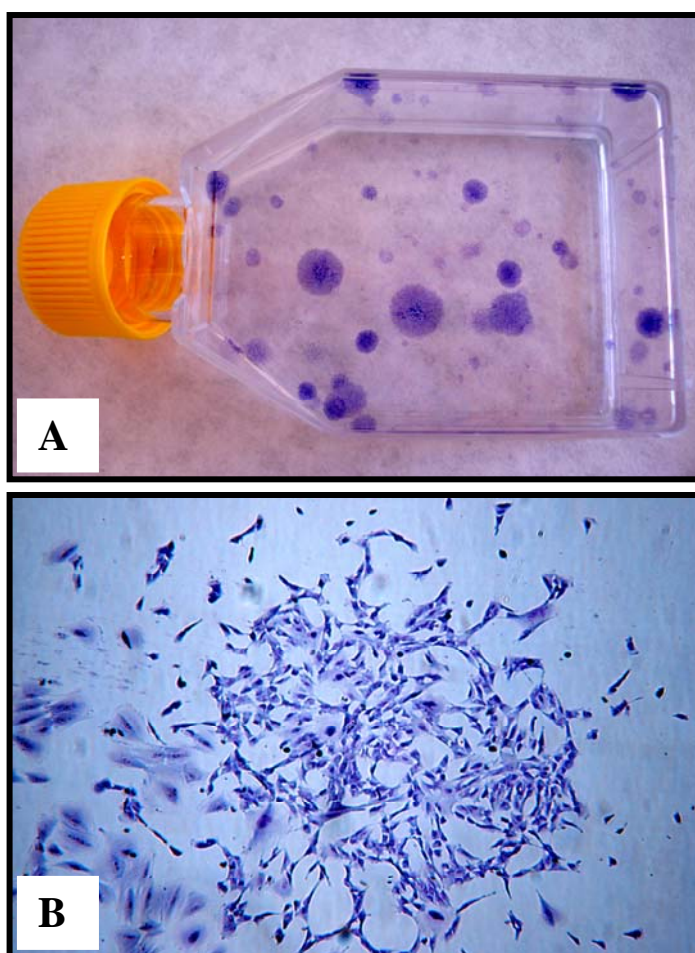


Figura 2 - Crescimento celular em colônias: **A)** análise macroscópica das colônias; **B)** visualização microscópica das colônias

5.1.3. Diferenciação celular de CTm em linhagem osteogênica

Sob a ação dos estímulos específicos e condições apropriadas, as CTm primárias foram capazes de se diferenciarem em osteoblastos. Através das colorações foi possível observar presença de cristais de carbonato e oxalato de cálcio bem como a atividade da fosfatase alcalina produzida pelas células após o estímulo. Nos controles negativos, ou seja, omissão dos estímulos, não foi observado diferenciação celular (Figura 3).

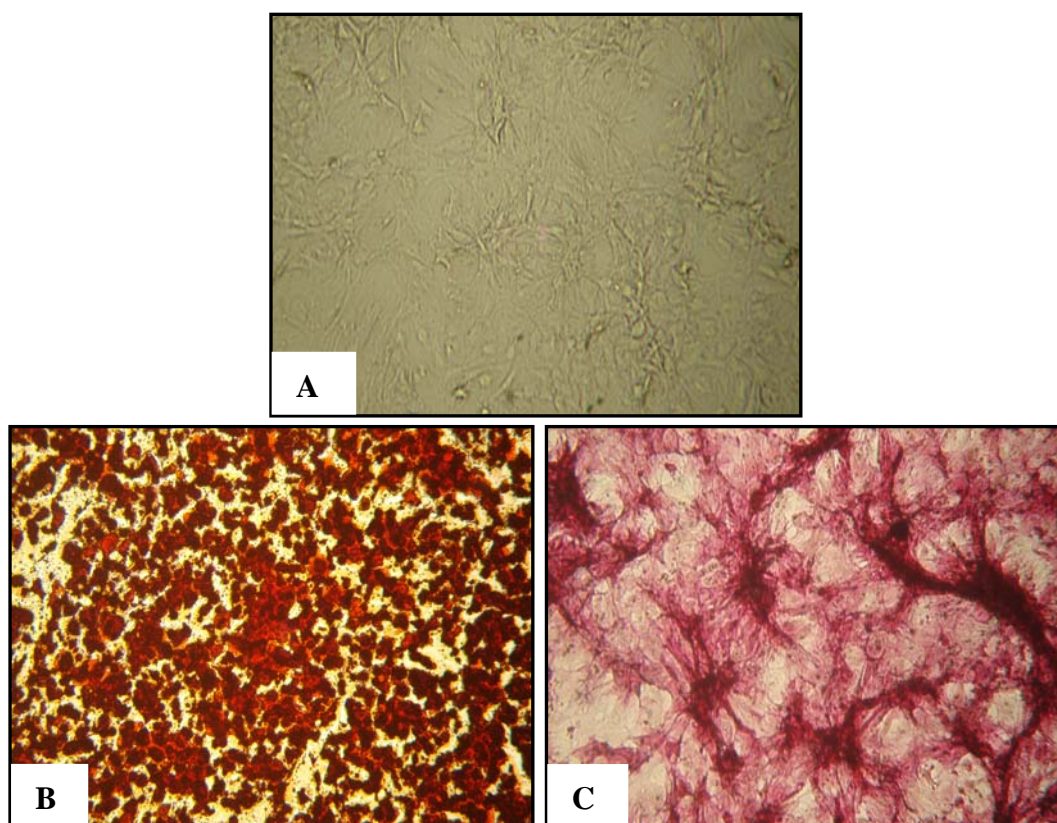


Figura 3 - Diferenciação das CMLA em células da linhagem osteogênica. **A)** Controle negativo da diferenciação celular **B)** Coloração vermelho de alizarina para visualização de calcificação; **C)** Coloração resultante da atividade da fosfatase alcalina produzida pelas células sobre substrato cromogênico

5.1.4. Diferenciação celular de CTm em linhagem condrogênica

Sob a ação dos estímulos específicos e condições apropriadas, as CTm primárias foram capazes de se diferenciar em linhagem condrogênica após 21 dias de cultivo. Através da microscopia ótica, lâminas coradas com HE (hematoxilina e eosina) apresentaram lacunas celulares compostas de glicoaminoglicanas e glicoproteínas. (Figura 4).

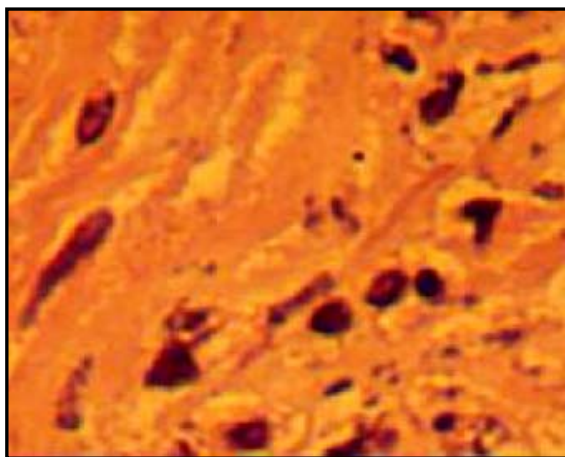


Figura 4 - Diferenciação das CMLA em células da linhagem condrogênica. Microscopia ótica demonstrando condrócitos e lacunas condrocitárias

5.1.5. Caracterização fenotípica das CTm

Os resultados demonstraram que as células mantidas em cultura expressaram com alta intensidade os antígenos de superfície característicos de CTm tais como, CD29, CD44, CD90 e CD105, presentes em $91\pm 5\%$, $74\pm 3\%$, $90\pm 8\%$ e $82\pm 5\%$ da população, respectivamente. Por outro lado, a expressão dos marcadores CD31 (célula endotelial), CD34 (célula-tronco hematopoiética - CTH), CD45 (pan-leucocitário) e CD117 (CTH) foram de baixa intensidade e registrada em apenas $1\pm 0,5\%$, $3\pm 3\%$, $4\pm 8\%$ e $1\pm 2\%$ da população, respectivamente. Os resultados da imunofenotipagem das CTm estão representados na forma de histograma (**Figura 6**).

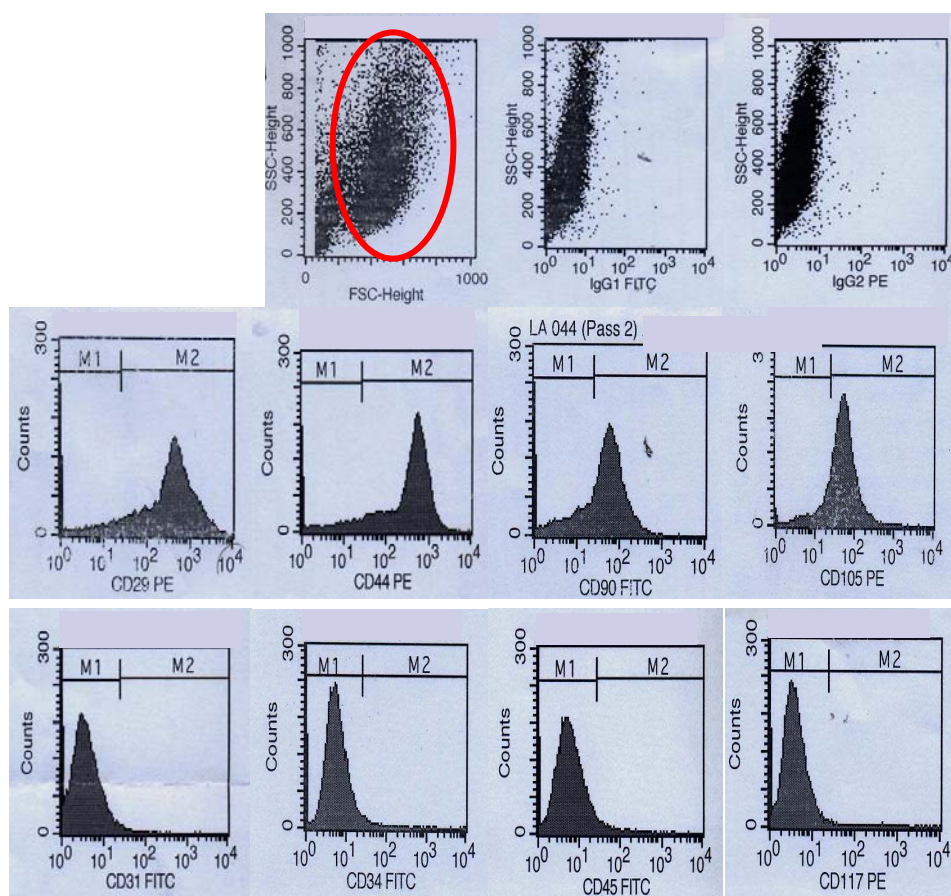


Figura 5 - Caracterização celular de marcadores de superfície por citometria de fluxo. CTm foram positivas para CD29, CD44, CD90 e CD105 e negativas para CD31, CD34, CD45, e CD117

5.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL “IN VIVO”

5.2.1. MODELO de OBSTRUÇÃO UNILATERAL do URETER (OUU)

Os animais foram submetidos a cirurgia experimental. A obstrução do ureter esquerdo foi realizada com sucesso em 100% dos animais uma vez que o modelo de OUU é simples de se realizar. Para que a obstrução fosse realmente eficaz e seguindo alguns protocolos sugeridos na literatura, foram realizados 2 pontos de obstrução no ureter (Figura 6).

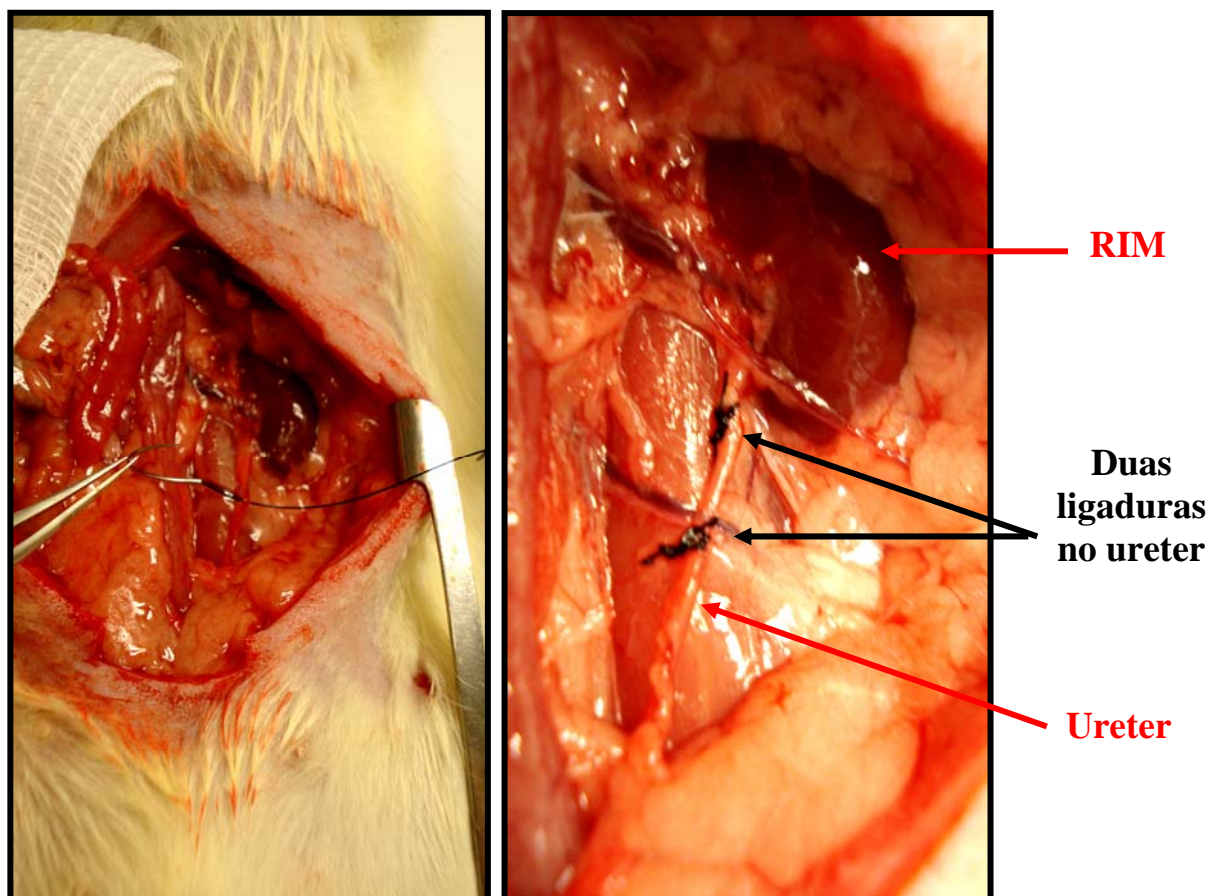


Figura 6 - Indução da lesão renal através do modelo de OUU

**Sham
(28 dias)**



**O UU
(7 dias)**



**O UU
(28 dias)**



Figura 7 - Visualização macroscópica dos rins nos diferentes grupos: **Sham**, animal após cirurgia fictícia e mantido por 28 dias; **O UU (7 e 28 dias)**, animal após obstrução do ureter esquerdo

5.2.2. INOCULAÇÃO de CTm na REGIÃO SUBCAPSULAR RENAL

As CMLA foram inoculadas diretamente no tecido renal, ou seja, via subcapsular renal ratos Wistar machos normais. Este modelo de inoculação já foi bem padronizado e estabelecido no laboratório de nefrologia celular e genética e molecular – LIM29 pelo grupo da Professora Dra. Irene Noronha.

O procedimento de inoculação das CMLA exigiu muito cuidado para que não ocorresse destruição da cápsula renal e nem hemorragia ao introduzir a agulha (Figura 8).

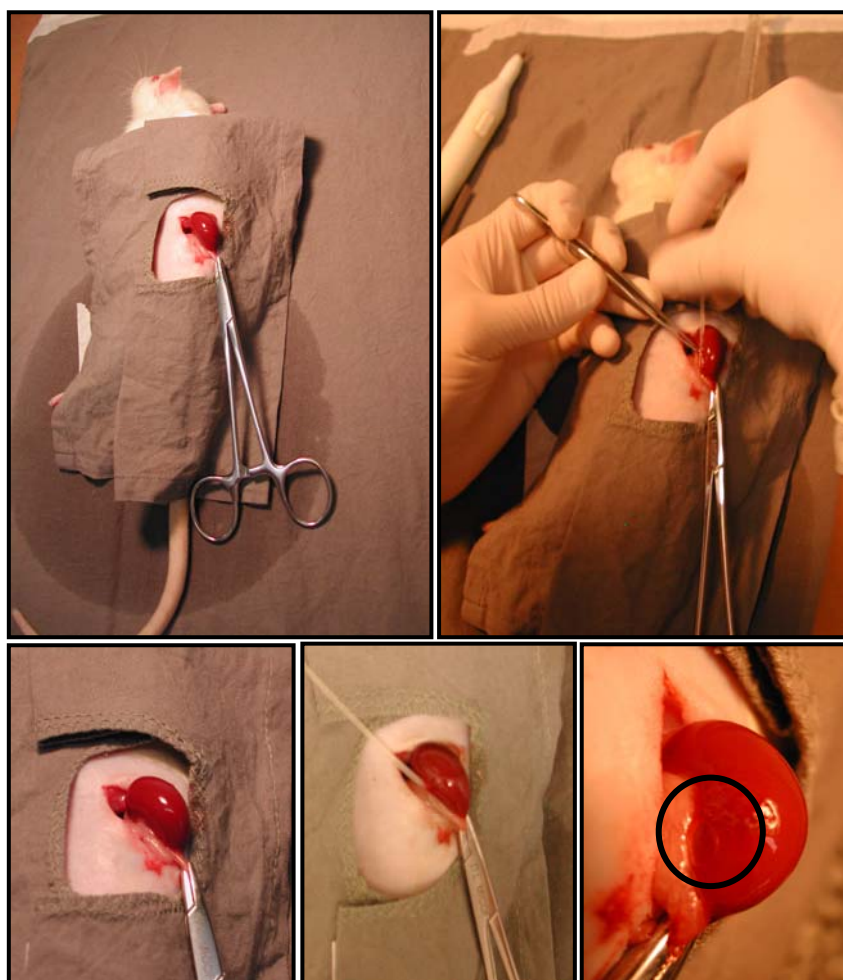


Figura 8 - Inoculação de CT sob a cápsula renal. A região delimitada indica o local exato que as células foram inoculadas

5.2.3. Volume Urinário

Aos 7 dias, os animais dos grupos Sham+CMLA e OUU+CMLA apresentaram um aumento não significativo do volume urinário em relação os grupos que não receberam as células-tronco, Sham e OUU ($14\pm 1,3$ mL e $16\pm 0,6$ mL vs $12\pm 2,2$ mL e $12\pm 0,4$ mL, respectivamente; *ns*).

Assim como aos 7 dias, os animais após 28 dias apresentaram valores semelhantes entre os grupos não apresentando assim diferença estatística.

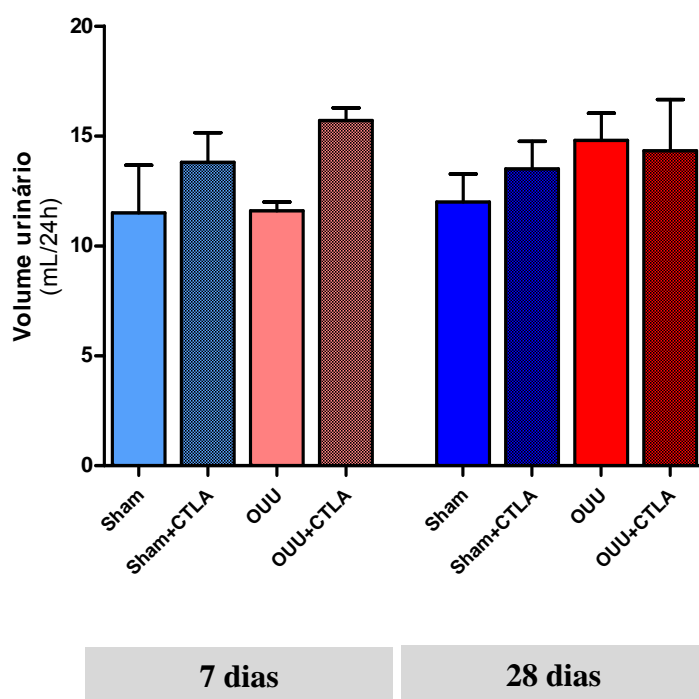


Figura 9 - Volume urinário dos animais nos diferentes grupos

5.2.4. Excreção de proteína urinária

Aos 7 dias, tanto os animais dos grupos Sham e Sham+CMLA excretaram proteína urinária dentro de valores normais ($11,2 \pm 2,1$ e $7,6 \pm 1,1$ mg/24h; respectivamente, *ns*) bem como os animais com obstrução unilateral do ureter sem ou com CTm ($8,7 \pm 0,5$ e $5,0 \pm 0,9$ mg/24h; respectivamente, *ns*). Entretanto os animais do grupo OUU+CMLA apresentaram uma diminuição significativa da proteinúria em relação ao grupo Sham ($p < 0,01$).

Após 28 dias, o grupo OUU apresentou um aumento significativo da proteinúria em relação aos grupos Sham e Sham+CMLA ($23,1 \pm 5,1$ mg/24h vs $14,1 \pm 0,7$ e $5,8 \pm 1,8$ mg/24h; respectivamente $p < 0,05$ e $p < 0,01$), sendo observada uma redução significativa nos animais com OUU e que receberam CMLA ($10,6 \pm 1,9$ mg/24h; $p < 0,01$ vs OUU).

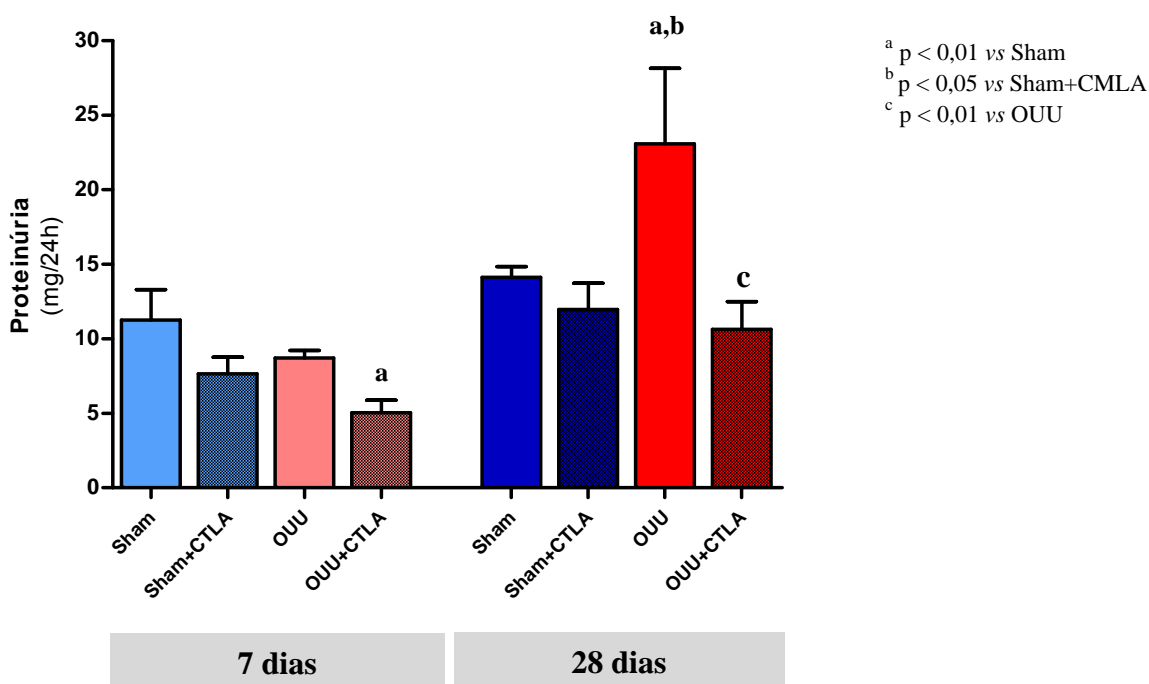


Figura 10 - Proteinúria dos animais nos diferentes grupos

5.2.5. Dosagem de creatinina sérica

A análise dos níveis de creatinina sérica revelou já após 7 dias de lesão o níveis mais elevados em relação ao grupo normal entretanto não significativo ($0,41 \pm 0,13$ mg/dL vs $0,26 \pm 0,01$ mg/dL; *ns*). A inoculação das CMLA na região da subcapsula renal não reduziram a concentração sérica de creatinina nos animais com OUU ($0,38 \pm 0,05$ mg/dL).

A mesma análise nos animais após 28 dias apresentou um aumento significativo no grupo OUU manteve níveis mais elevados de creatinina em relação ao Sham ($0,51 \pm 0,11$ mg/dL vs $0,22 \pm 0,29$ mg/dL; $p < 0,01$). Por outro lado, os animais com OUU e receberam CMLA apresentaram uma diminuição da creatinina sérica em relação ao grupo OUU ($0,38 \pm 0,08$ mg/dL), porém não significativa.

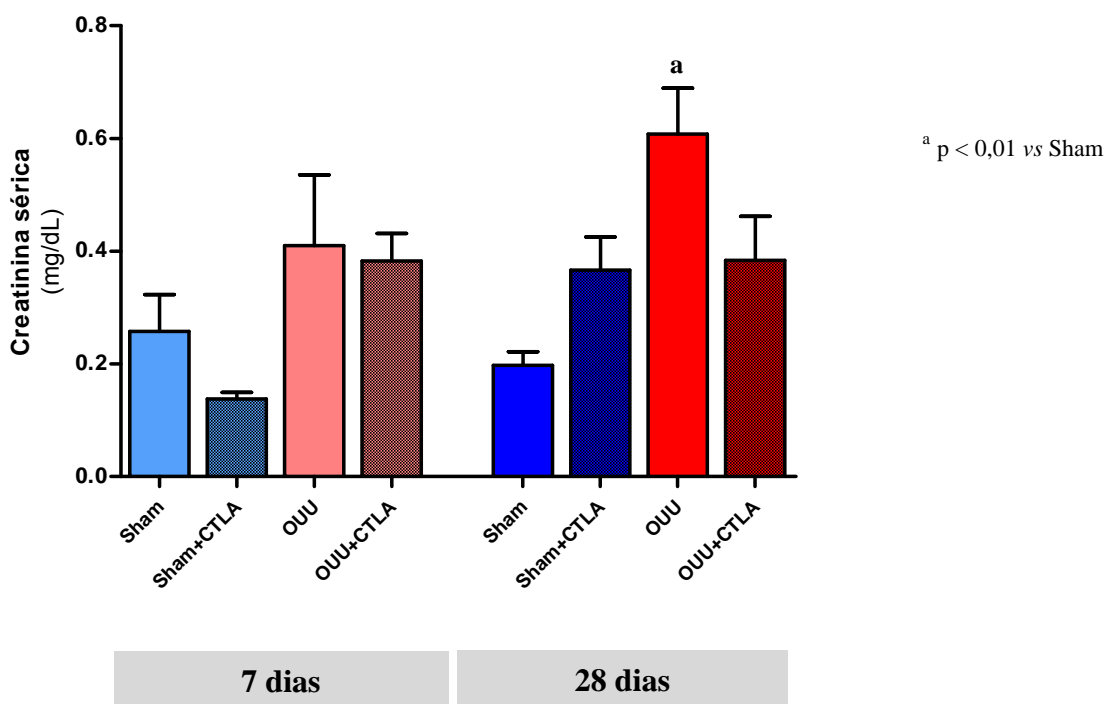


Figura 11 - Creatinina sérica dos animais nos diferentes grupos

5.2.6. Dosagem de ureia sérica

A análise dos níveis de ureia sérica revelou que com 7 dias de lesão, o grupo OUU apresentou níveis mais elevados em relação aos grupos Sham e Sham+CMLA (45 ± 8 mg/dL vs 31 ± 3 e 35 ± 3 mg/dL; *ns*). As CMLA inoculadas na região da subcapsula renal aumentaram a concentração de ureia nos animais OUU quando comparada com o grupo somente com lesão (56 ± 5 mg/dL; *ns*) e apresentou diferença significativa em relação ao grupo Sham ($p < 0,01$).

Após 28 dias, o grupo OUU manteve níveis mais elevados de ureia em relação ao grupo Sham+CMLA (53 ± 7 mg/dL vs 34 ± 2 mg/dL; respectivamente, $p < 0,01$). Permanecendo elevado o nível no OUU+CMLA (54 ± 3 mg/dL; $p < 0,05$ vs Sham+CMLA).

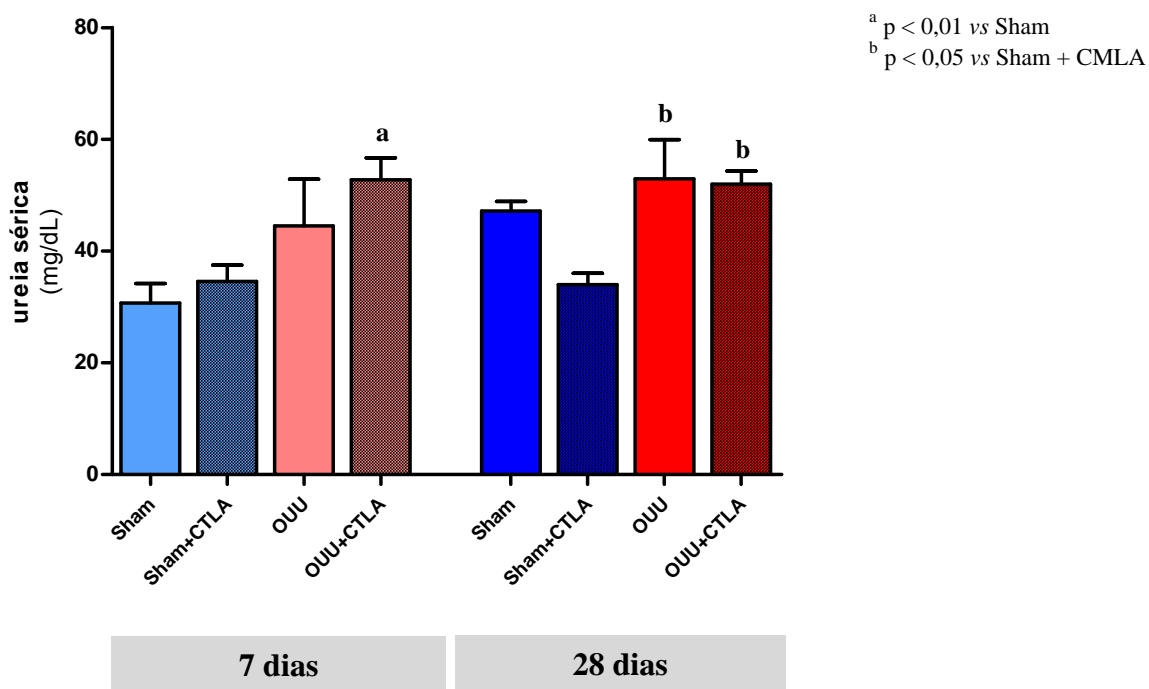


Figura 12 - Uréia sérica dos animais nos diferentes grupos

5.2.7. Massa renal direita (MRD) e esquerda (MRE)

Com relação a análise da MRD após 7 dias foi constatado um aumento significativo tanto dos animais do grupo OUU quanto dos animais OUU+CMLA ($1,2690 \pm 0,1g$ e $1,236 \pm 0,1g$; respectivamente) em relação aos animais do grupo Sham e Sham+CMLA ($0,9858 \pm 0,0g$ e $0,9923 \pm 0,1g$; $p < 0,01$ e $0,05$, respectivamente).

Após 28 dias, os grupos OUU e OUU+CMLA ($1,4810 \pm 0,1g$ e $1,7820 \pm 0,1g$; respectivamente) apresentaram um maior peso da massa renal em relação aos animais grupo Sham e Sham+CMLA ($1,1540 \pm 0,0g$ e $1,2540 \pm 0,0g$; $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente).

Para a análise da MDE após 7 dias o mesmo achado com rim direito foi observado. Tanto o grupo OUU quanto o grupo OUU+CMLA ($1,6030 \pm 0,1g$ e $1,5735 \pm 0,1g$; respectivamente) apresentaram um aumento significativo da MRE em relação aos grupos Sham e Sham+CMLA ($0,9553 \pm 0,0g$ e $0,9580 \pm 0,0g$; $p < 0,01$ e $0,05$; respectivamente).

Entretanto, após 28 dias, os animais não apresentaram diferença da MRE entre os grupos, apenas um discreto aumento da massa renal permanecia no grupo OUU+CMLA ($1,4250 \pm 0,1g$) em relação os animais Sham, Sham+CMLA e OUU ($1,1390 \pm 0,0g$, $1,1960 \pm 0,0g$ e $1,2120 \pm 0,1g$; respectivamente, *ns*).

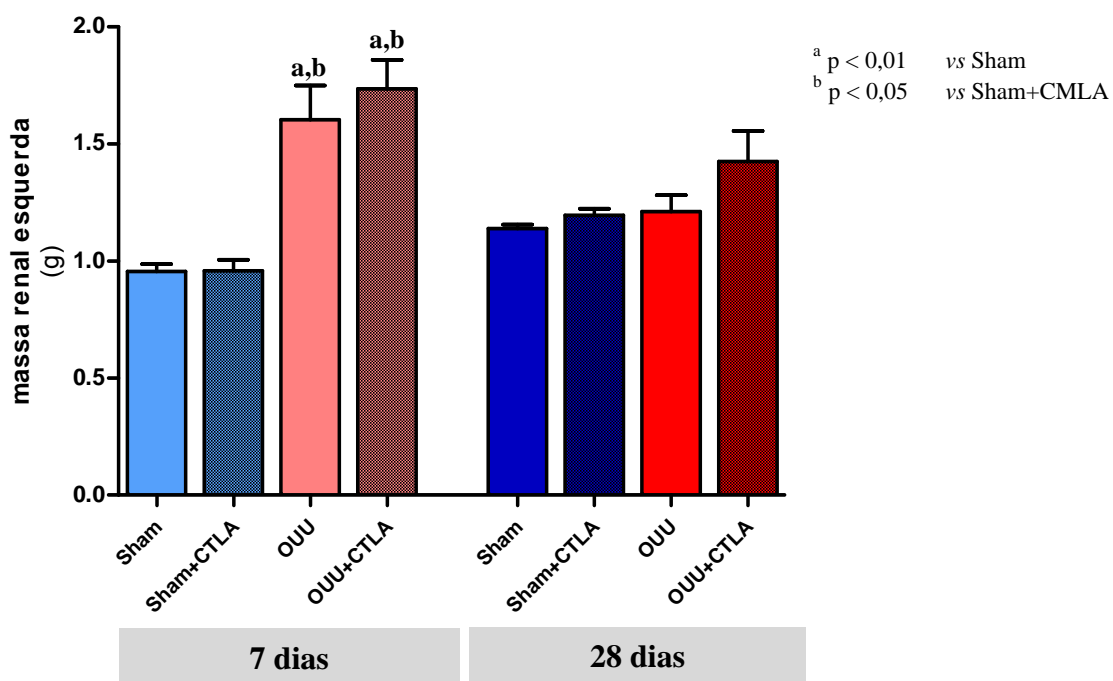
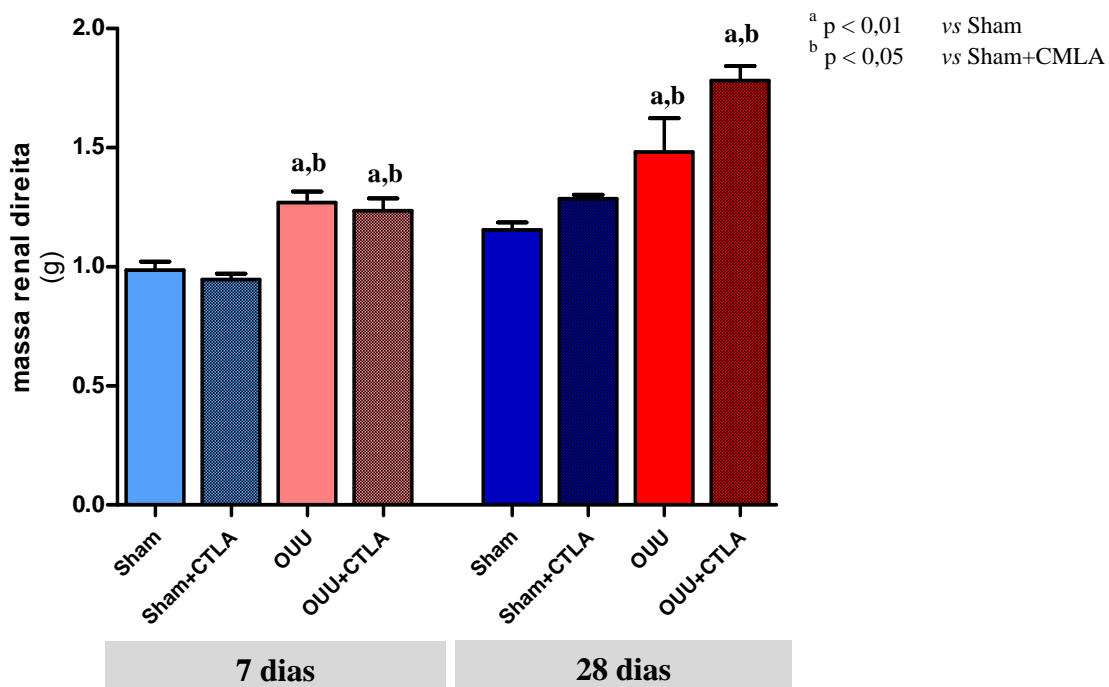


Figura 13 - Peso da massa renal tanto direita quanto esquerda dos diferentes grupos

5.2.8. Fibrose intersticial

Os animais após 28 dias de OUU ($5,5 \pm 0,25$; $p < 0,0001$ vs Sham e Sham+CMLA) apresentaram um aumento significativo da fibrose intersticial em relação aos grupos Sham e Sham+CMLA ($0,12 \pm 0,02$ e $0,18 \pm 0,03$ pontos por campo). O mesmo foi observado nos animais com OUU que receberam CMLA ($3,5 \pm 0,82$; $p < 0,001$ vs Sham e Sham+CMLA) (Figura 14), ou seja, um aumento significativo em relação aos animais dos grupos controles. Quando comparado os animais com OUU+CMLA em relação aos animais com OUU, apesar de constatar uma diminuição da fibrose intersticial não foi evidenciado uma diferença significativa. A figura 15 mostra em coloração Tricômio de Masson, a análise da fibrose intersticial dos grupos Sham, OUU e OUU+CTLA após 28 dias.

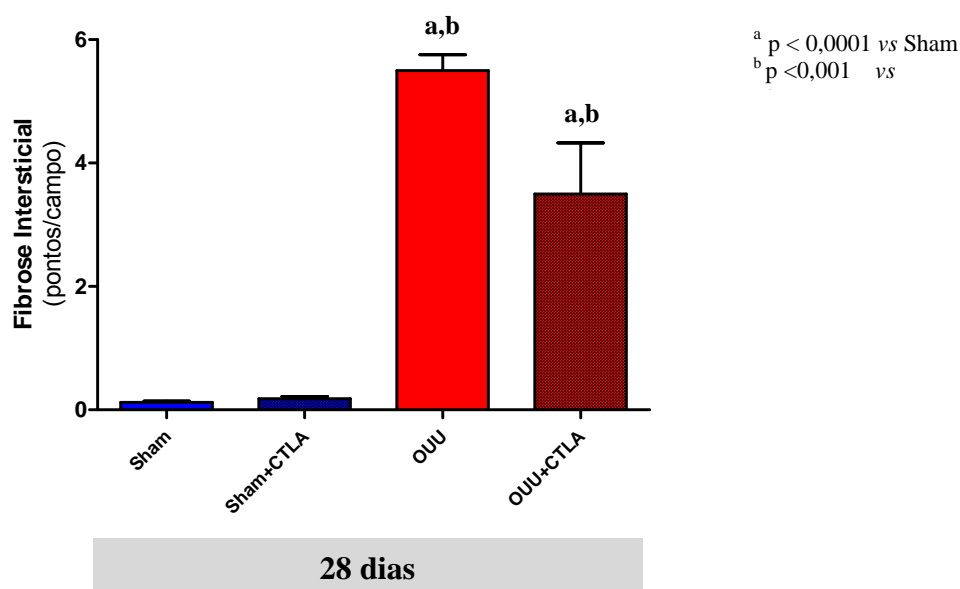


Figura 14 - Fibrose intersticial nos animais após 28 dias de experimento

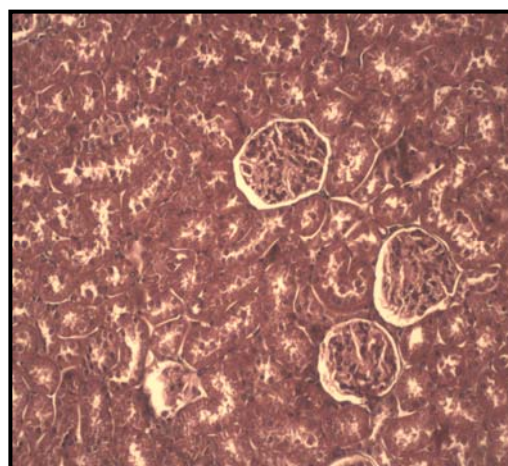
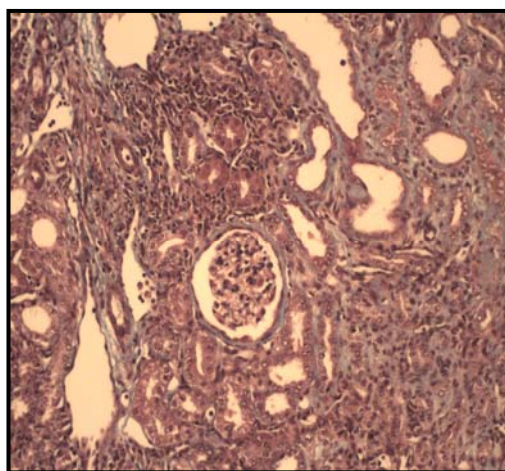
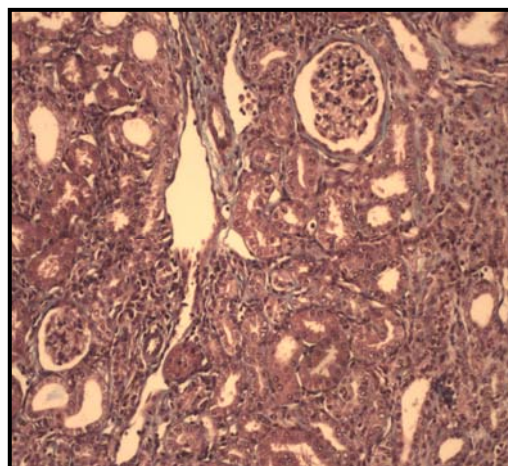
**Sham****O UU****O UU+CTLA**

Figura 15 - Fotomicrografia das lamina coradas com Tricômio de Masson para a análise de fibrose intersticial dos grupos Sham, O UU e O UU+CTLA após 28 dias (aumento de 100x)

6. DISCUSSÃO

Com o advento da ultrassonografia nas últimas décadas do século passado novas perspectivas se desnudaram e a avaliação do ambiente intra-uterino tornou-se uma estrada com diversos e fascinantes cenários. O feto passou a ser encarado como paciente único. Por primeiro, com o objetivo do diagnóstico e com a classificação das malformações e a seguir, na tentativa de avaliar o prognóstico e estabelecer condutas clínicas, concomitante à avaliação do risco materno, tornando o binômio mãe-feto cada vez mais uníssono. O tratamento intrauterino de algumas malformações, já no início desse século, ainda é motivo de pesquisas, muitas ainda em fases experimentais, outras já em fase clínica, com as cirurgias minimamente invasivas^{42,43,44}, tentando melhorar o prognóstico fetal, sem elevar o risco materno.

No escopo das alterações morfológicas diagnosticáveis no período fetal as malformações do trato urinário apresentam-se como uma das mais frequentes, respondendo por um terço das anomalias fetais, em particular a hidronefrose, com incidência de 2-9 por mil⁴⁵.

As condutas clínicas das hidronefroses ainda carecem de uniformidade, visto que o espectro de tal moléstia é variado, com dúvidas quanto a sua etiologia, classificação e prognóstico pós-natal. O objetivo principal das intervenções pré-natais é preservar a função renal, mantendo a homeostase da cavidade amniótica até a viabilidade ou ainda, a maturidade fetal. As opções de intervenções intra-uterinas vão desde o

acompanhamento ultrassonográfico, com posterior avaliação pós-natal, podendo em alguns casos ser necessárias análises da função renal pela bioquímica urinária; passando pelos procedimentos invasivos, como a colocação de drenos vésico-amnióticos, terminando em alguns casos com a solicitação da interrupção da gestação, em casos incompatíveis com a vida extra-uterina. A utilização dos procedimentos invasivos na tentativa de manter a função renal ainda é objeto de discussão na literatura especializada, principalmente quanto o período de sua indicação e seus resultados⁴⁵. São descritas taxas de sobrevivência que variam de 0% em casos com prognóstico ruim a 42 % em casos de bom prognóstico. Em casos submetidos a intervenções invasivas, as taxas de sobrevivência oscilam entre 38% nos casos de prognósticos ruins e 69% nos casos de bom prognóstico. No caso específico dos drenos intra-amnióticos, são descritas por alguns autores⁴⁶, taxas de sucesso na colocação dos mesmos ao redor de 50%, Temos o mesmo índice para complicações, tais como parto prematuro e morte fetal⁴⁶, e de 47% o índice de sobrevivência⁴⁶. Já a taxa de sobrevivência pós-natal, em estudo de 5 anos, nos casos tratados com drenos intra-amnióticos, varia de 9% a 34%, quando existe presença de hipoplasia pulmonar, 22% na insuficiência renal, 43% com disfunção vesical⁴⁷. Esses números mostram a gravidade da doença, com a necessidade de alternativas de tratamento e prevenção, sempre com o objetivo da manutenção da função renal fetal. A utilização da terapia celular fetal, através da utilização de células-tronco pode desempenhar um novo enfoque nesse particular. A utilização de células-tronco adultas em ensaios pré-clínicos e clínicos é amplamente

demonstrado na literatura sobre o tema, levando em alguns casos, a resultados animadores^{27,28,29,30,31}.

Algumas células-tronco possuem características como o seu fácil isolamento, cultivo, manipulação, potencial de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas^{48,49}.

A escolha do líquido amniótico como fonte de células mesenquimais baseia-se, como exposto na introdução, em fonte abundante desse tipo celular, a maioria das células fetais proliferam mais rapidamente, em meio de cultura, quando comparadas às células após o nascimento. Também respondem melhor aos estímulos ambientais que células maduras. Sobrevivem melhor com menores níveis de tensão de oxigênio, resistindo melhor à hipóxia em meio de cultura. Apresentam menor chance de rejeição em aplicações alogênicas e implantes xenólogos são melhor tolerados. Produzem altos níveis de fatores tróficos e angiogênicos, o que aumenta a possibilidade de crescimento após implante, e até dos tecidos vizinhos, mesmo sem enxertia demonstrada^{50,51}.

Outra vantagem no uso de células fetais na terapia celular decorre do fato do mesmo minimizar as limitações de tempo, antes que a doença estabeleça lesões definitivas. A coleta, tão logo seja feito o diagnóstico da doença, permite o cultivo e expansão, em paralelo à gestação, para utilização o mais precoce possível, seja por inoculação direta, terapia gênica ou confecção de enxerto autólogo.

As técnicas de isolamento e identificação das CMLA já são conhecidas e objeto de publicações sobre o tema. Na Clínica Obstétrica da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Duarte, em tese de doutorado⁵², descreveu a metodologia de cultura e identificação dessas células, método que reproduzimos na confecção desse trabalho.

As células mesenquimais estromais multipotentes apresentam-se como células fibroblastóides alongadas e fusiformes, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante, à microscopia de fase (Figuras 1 e 2). Observa-se transição durante o cultivo⁵³, passando para células grandes, achatadas e largas, com proliferação lenta⁵⁴. Coram-se pela fosfatase alcalina, sudan-black, colágeno IV, fibronectina e não se coram pela esterase. Elas expressam em níveis variados os marcadores CD29, CD105, CD44, CD44 e Stro-1 (Figura 4), não expressando CD14, CD34, CD45 (marcadores celulares hematopoiéticos) e nem CD31, KDR (marcadores celulares endoteliais)^{55,56}. Elas compartilham antígenos expressos por múltiplas linhagens celulares⁵⁷.

Em cultura, essas células apresentam três fases: a) inicial, com duração de 3 a 4 dias, logo após o plaqueamento, quando o crescimento celular é muito lento; b) logarítmica, durante as primeiras passagens, apresenta um crescimento acelerado; c) *plateau*: inicia-se quando a célula atinge a senescência e perde a capacidade de expansão^{58,59}.

Após cultivo celular em baixa densidade, elas originam colônias⁶⁰. Presume-se que estas colônias sejam derivadas de uma única célula precursora⁶¹. Podem ser expandidas por mais de 50 vezes quando plaqueadas em baixa concentração celular (1,5 células/cm²), e menos, quando plaqueadas em concentrações maiores⁵⁹. São necessárias de 24 a

33 horas para duplicação celular durante a fase de crescimento logarítmico^{62,63}, com capacidade de duplicação de 4 a 50 vezes^{58,60,64}.

Outra característica importante das CTM é a sua capacidade de diferenciação em várias linhagens mesenquimais como condrogênica e osteogênica (Figuras 3 e 4)^{65,66}. Tais características dão às mesmas, potencial de regenerar tecidos/órgãos lesados. A perspectiva de utilizá-las em terapias que possam recuperar e/ou melhorar a função renal após lesão, motiva a realização de estudos com a utilização das mesmas 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, através de marcadores como proteinúria, creatinina sérica e taxa de filtração renal, após tratamento com as mesmas⁶⁷.

Imasawa e colaboradores, por primeiro descreve o papel das células-tronco mesenquimais (CTM) em doença renal experimental, demonstrando melhora da doença em ratos com nefropatia de IgA espontânea após transplante de medula óssea⁶⁸. Encontramos vários estudos experimentais em modelo animal utilizando CTM, originárias da medula óssea, atuando na regeneração tecidual renal, contribuindo não apenas com a renovação do epitélio tubular renal, como também na regeneração tubular após insulto renal agudo⁶⁹. Recentemente, em nosso meio, foi demonstrado que o uso de CTM derivadas da medula óssea em modelo de nefropatia crônica progressiva por ablação 5/6 bloqueou a progressão da doença renal. Constatou-se que a inoculação de CTM promoveu efeitos renoprotetores,

com melhora da hipertensão arterial, proteinúria, albuminúria, diminuição da creatinina sérica, além da melhora dos parâmetros histológicos, efeitos já detectados após 15 dias da indução da lesão e mais consistentes depois de 30 dias⁷⁰.

A utilização das CTM originárias do líquido amniótico para o tratamento de doenças renais é motivo, ainda não frequente, de discussão na literatura.

Perin e colaboradores⁷¹, em 2007, demonstra a capacidade de diferenciação das CTM do líquido amniótico em células renais.

De Coppi e colaboradores, em 2007 descreve utilização dessas células na lesão da musculatura de bexiga urinária³⁷.

Recentemente, Da Sacco e colaboradores, descreve novo marcador para caracterizar as CTM no líquido amniótico, com novos subgrupos celulares⁷².

A utilização das CTM é avaliada em vários modelos animais com doença renal aguda e crônica, sendo o modelo de obstrução ureteral unilateral o que mais mimetiza a doença renal fetal mais comum⁷³.

O modelo animal tem suas limitações, principalmente devido às características espécie-específica, porém esse tipo de experimento continua a ser fonte de conhecimento e alternativa para desenvolvimento de novas terapias, além de passo essencial para o tratamento em humanos. O objetivo principal de todo experimento com animais é conhecer melhor a etiopatogenia e a história natural da doença tornando as opções de tratamento mais eficientes. No caso das doenças obstrutivas renais o

tratamento deve ser focado não apenas em fornecer a simples drenagem da urina, mas também tratar o impacto da obstrução no desenvolvimento renal⁷⁴.

Há três tipos de modelos experimentais para o estudo das doenças renais, o primeiro é o modelo genético, baseado na mutação espontânea da doença em um animal isolado. O segundo são os modelos cirúrgicos, nos quais a doença é induzida pelo procedimento cirúrgico e o terceiro seria aquele em que a doença é induzida pelo bloqueio da ação de determinados genes^{74,73}.

Estudos com modelos de OUU são descritos em vários animais como carneiros, opção considerada cara por ser o animal de grande porte, o gambá, por se marsupial, a opção da manipulação fetal fora do ambiente uterino pode ser realizada, porém a correlação entre a histologia e função renal mostrou-se prejudicada. Os modelos utilizando ratos já são bem definidos, inclusive no período de neonatal (até 2 semanas do parto), com boa correlação com o período fetal, considerando que a maturação renal no primeiro mês de vida do rato é análoga à do feto humano no segundo e terceiro trimestre de gestação⁷⁵.

O modelo animal escolhido para esse estudo foi rato já com aproximadamente 45 dias de vida, pelo ineditismo, na utilização de CMLA humana injetadas no rim do rato (configurando o xenotransplante), optamos por modelo já estabelecido pelo grupo de estudo, exceto pela opção pela OUU em vez da ablação 5/6 (modelo de que retira 5/6 da massa renal total)⁷⁰. Tentamos, com projeto piloto, a manipulação de ratos recém-

nascidos, porém ainda sem sucesso, por dificuldades técnicas e alta mortalidade dos animais.

O cálculo amostral foi realizado observando os parâmetros descritos no trabalho anterior deste grupo de pesquisadores⁷⁰, ficando em torno de 10 animais por grupo de estudo, porém houve mortalidade inesperada, ficando o grupo final com total de 55 animais (Grupo de 7 dias: 4 no grupo Sham, 6 no grupo Sham + CMLA, 5 no grupo OUU, e 8 no grupo OUU+CMLA. No grupo de 28 dias: 5 no grupo Sham, 6 no grupo Sham + CMLA, 5 no grupo OUU, e 6 no grupo OUU+CMLA), amostra considerada suficiente por alguns trabalhos sobre esse modelo animal^{74,18}.

O ineditismo do modelo de xenotransplante (humano –rato) com a utilização da inoculação das CTM oriundas do líquido amniótico humano em região subcapsular renal do rato, nos permite observar um longo caminho com várias dúvidas em relação a imunomodulação e ação local dessas células, já descritas na literatura em relação a outros modelos visando principalmente a terapia cardíaca e pancreática^{76,77}.

A utilização da via subcapsular em detrimento de outras vias de inoculação, já abordada na introdução desse trabalho, é justificada pela ausência da dependência do fluxo sanguíneo vascular que pode expor o tecido a poucas células injetadas e essas poderiam permanecer por menor período no local desejado. A via subcapsular foi a escolhida pelo grupo em estudo prévio que demonstrou com ineditismo a presença da célula nessa região renal, sua migração e distribuição a partir desta região em direção à cortical e à medular. Sendo verificado que após 5 dias a concentração

celular se manteve 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. 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 prolongado³⁹. Não foi objetivo, desse trabalho, reproduzir tal achado já demonstrado pelo nosso grupo de estudo anteriormente em trabalho em vias de publicação.

Embora os estudos iniciais tenham descrito o potencial papel das CTM participando da regeneração tubular, o entendimento atual é que elas são responsáveis por pequena percentagem da recuperação tubular. Considerando-se a baixa percentagem de CTM nos locais da lesão, juntamente com significativa resposta proliferativa e renoprotetora à IRA, vários estudos sugerem que a infusão de CTM exerce seus efeitos terapêuticos através de mediadores parácrinos e efeitos imunomoduladores^{78,79}.

Chevalier e colaboradores⁸⁰ estudam as consequências da obstrução ureteral unilateral temporária em ratos por até 28 dias, e constata que ocorre lesão definitiva mesmo em obstruções de 5 dias, com persistência da lesão vascular, glomerular, tubular e intersticial. Diferentemente desse, o presente estudo avalia as mudanças de parâmetros de função e morfologia renal vigindo a OUU. Essa análise após a lesão estabelecida e com via excretora

renal patente não corresponde ao nosso objetivo, e talvez pudesse demonstrar resultado diferente, uma vez que o ambiente de ação das CMLA mudaria, sem a brutal compressão exercida pela completa obstrução da via excretora renal e colabamento vascular tecidual. Este estudo inicial, embora pioneiro, procura demonstrar as transformações ocasionadas à função renal ainda na vigência da obstrução em animal adulto, mesmo sendo ela prolongada, como no caso de 28 dias. Estabelecido então os limites da análise dos achados do presente estudo, devemos esclarecer que novas avaliações são necessárias ainda no modelo de animal adulto, para só então nos aventurarmos no modelo intrauterino.

Quanto ao volume urinário, embora não significativo estatisticamente, observa-se um aumento com a inoculação de CMLA, somente não observado no grupo de 28 dias após OUU, talvez pelo alto grau de lesão tecidual. O volume urinário é consequência da taxa de filtração glomerular e um aumento nessa taxa pode ser relacionado à melhora da perfusão tecidual, por possível ação parácrina das CMLA. Para uma melhor avaliação desse parâmetro poderíamos imaginar um desdobramento desse estudo, com lesão não tão agressiva como a obstrução total, seguida de avaliação da perfusão sanguínea e taxa de filtração glomerular. Outro aspecto que pode esclarecer melhor essa questão é no aumento do número de CMLA inoculadas, tentando estabelecer no modelo a quantidade de inoculo ideal para o efeito esperado.

A queda na proteinúria representa marcador importante da melhora da função renal, e ela é significativa em todos os grupos de estudo, sendo

exuberante no grupo de 28 dias após OUU e inoculação de CMLA, talvez o resultado mais importante do presente estudo. A análise por separado do resultado da proteinúria revela que com sete dias de obstrução observa-se que todos os grupos apresentam excreção dentro dos valores de normalidade, podendo representar uma adaptação à agressão pela obstrução ureteral. Mesmo nesse caso, observa-se menor excreção nos grupos com inoculação de CMLA. No grupo de 28 dias, a excreção de proteínas urinárias encontra-se acima da normalidade em todos os grupos, exceto naqueles que receberam CMLA, com redução estatisticamente significativa da proteinúria. Esse achado pode ter ocorrido, à semelhança do aumento de volume urinário, por efeito parácrino, uma vez que não se observou neo-formação de unidades túbulo-glomerulares naqueles rins em que se injetou as CMLA. Esse resultado nos parece extremamente importante, devendo direcionar os próximos estudos, no sentido de um melhor entendimento do processo, principalmente na ação exercida no rim contra-lateral e tentando esclarecer qual a via de influência desses prováveis fatores de liberação.

Outro marcador importante da função renal é a dosagem de creatinina sérica, que também mostrou tendência de queda nos grupos após inoculação de CMLA. Em separado essa análise revelou um aumento do nível de creatinina sérica após a obstrução em relação ao controle, sendo que no grupo de 7 dias, após inoculação essa tendência à melhora foi menor e quando ocorreu aumento importante nos níveis de creatinina sérica (grupo de 28 dias), o grupo com inoculação de CMLA mostrou queda maior, talvez

identificando necessidade de maior agressão para resposta a esse parâmetro. Da mesma maneira que em relação à proteinúria o foco das investigações deve mirar a liberação de fatores, pelas CMLA, que promovam melhor filtração glomerular. Outro parâmetro analisado, a dosagem de ureia sérica, mostrou, como esperado, aumento após OUU. Quanto à inoculação de CMLA observou-se resultado interessante e contraditório. No grupo mais precoce, de 7 dias notou-se aumento do seu nível após inoculação, enquanto que no grupo mais tardio pós-obstrução, manteve-se inalterado. Como ela também reflete função renal, merece melhor estudo, podendo corresponder a processo diferente de ação em relação à proteinúria e dosagem de creatinina sérica.

Observou-se aumento da massa renal nos casos de obstrução unilateral, como esperado. A comparação entre a massa renal do grupo em que se realizou a inoculação de CMLA e o controle não demonstrou diferença significativa. A avaliação da massa renal é realizada, na prática experimental, com rim total. No modelo de OUU observa-se grande dilatação da via excretora, com acúmulo de urina, que influencia o resultado final da massa. A análise mais acurada desse fato, embora não pertinente ao escopo desse estudo, mostrou que no presente trabalho, o aumento foi devido não a um aumento de parênquima, mas sim pela dilatação tubular e acúmulo de urina. O motivo dessa maior dilatação da via excretora renal deve ser motivo de investigação em trabalho posterior, incluindo o papel da CMLA.

O modelo de OUU é clinicamente identificado pela falência da função renal e histopatologicamente pela presença de fibrose intersticial, atrofia tubular, apoptose e infiltrado inflamatório. O período de estudo dessas variáveis na maioria dos modelos de OUU é de 2 a 14 semanas⁸¹. Em nosso trabalho optamos pela avaliação no 7º e 28º dia, esse último mais tardio que a literatura no intuito de analisar a doença em estágio mais grave, verificando o possível efeito da CMLA nessa fase da doença renal.

Optamos pela análise da presença da fibrose intersticial pelo método descrito por Chevalier e colaboradores⁷⁵, método este já descrito em trabalho anterior do grupo⁷⁰. Tal método mostrou-se reprodutível.

Observamos diminuição da fibrose intersticial nos animais com OUU+CMLA em relação aos animais com OUU. Apesar de constatar diminuição da fibrose intersticial, não foi evidenciado uma diferença significativa. A ausência de significância estatística dessa análise causou surpresa, já que a avaliação foi realizada com 28 dias de OUU, tempo considerado tardio, causando mais dano ao tecido renal. A fibrose intersticial é descrito como o fenômeno final no mecanismo histopatológico da obstrução ureteral, sendo marcador importante da gravidade da doença.

A ação da CMLA na fibrose intersticial foi limitada sendo achado semelhante ao descrito por Cavaglieri com outro modelo animal e com células-tronco de medula óssea⁷⁰. Porém, diferente do descrito por Semedo e colaboradores, que utilizando o mesmo modelo, constataram uma melhora da fibrose intersticial quando administradas 3 doses de CTM⁸². Tal achado

precisa ser melhor estudado, pois com uma quantidade maior de inóculo, ou em associação com algum fator de crescimento, pode-se conseguir melhora.

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 em modelos de doença renal crônica por ablação 5/6^{83,84}.

Podemos destacar também a possibilidade de limitação técnica do método para a avaliação desse achado histológico, a literatura sobre o tema não destaca nenhum método como “padrão ouro” para essa análise, sendo descritos outros métodos subjetivos como o semiquantitativo, outros com maior complexidade técnica e melhor reprodutibilidade¹⁸.

Considerando que o possível efeito protetor das CT baseia-se na sua influência no microambiente inflamatório, já descrita na literatura, esse efeito não foi objeto de observação do presente estudo, que também não contemplou o impacto imunológico das CMLA no tecido renal, hipóteses já descritas por alguns autores e que podem influenciar os resultados histológicos e funcionais⁷⁶.

Há de se esclarecer que o tipo de lesão renal provocado pela obstrução completa unilateral é bastante grave, e mesmo assim se observou melhora dos padrões de função renal. O tipo de ação das CMLA parece ser por fator parácrino, que estabeleceram a mudança nos padrões analisados, uma vez que não houve alteração significativa na histologia.

O resultado do presente trabalho, de possível efeito parácrino, está de conformidade com os dados da literatura em inoculação de células-tronco mesenquimais em lesão renal, embora com modelos animais diferentes do presente^{85,86,87}.

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.

Concluindo, células do líquido amniótico apresentam células com fenótipo de células-tronco mesenquimais, com capacidade de diferenciação osteogênica e condrogênica⁵². A via sub-capsular de administração, já demonstrada ser eficiente em outros estudos⁷⁰, mostrou ser capaz de melhorar os índices de função renal, após obstrução ureteral unilateral nos grupos de sete e vinte e oito dias, por provável efeito parácrino. Também observou-se tendência de melhora da fibrose intersticial nos casos de inoculação de CMLA, porém não significativa.

O presente trabalho, de caráter pré-clínico, é o início de longa jornada no estudo de possíveis tratamentos intrauterinos dos fetos acometidos com doença até agora sem tratamento ou dependentes de procedimentos para amenizar seus efeitos, no órgão afetado, ainda vinculado à procedimentos invasivos com riscos elevados ao binômio mãe-feto.

7. REFERÊNCIAS

1. Grisoni, E. R., Gauderer, M. W., Wolfson, R. N., and Izant, R. J., Jr. Antenatal ultrasonography: the experience in a high risk perinatal center. *J Pediatr. Surg.* 1986Apr.;(21)358-361.
2. Elder, J. S. Antenatal hydronephrosis. Fetal and neonatal management. *Pediatr. Clin. North Am.* 1997Oct.;(44)1299-1321.
3. Moore, K. L. *Urogenital System.* 1988;
4. Buerkert, J. E. *Obstructive Uropathy.* 1989;808-810.
5. Campbell, M. F. *Urinary Obstruction.* 1970;(3rd)1772-1793.
6. Zugaib, M. *Medicina Fetal.* 2004;(2a.)
7. Dumez, Y. *Sindrome d'insuffisance rénale foetale.* *Annales Urol* 2003;(38)173-79.
8. Reinberg, Y., de, Castano, I, and Gonzalez, R. Prognosis for patients with prenatally diagnosed posterior urethral valves. *J Urol* 1992July;(148)125-126.
9. Cusick, E. L., Didier, F., Droulle, P., and Schmitt, M. Mortality after an antenatal diagnosis of foetal uropathy. *J. Pediatr. Surg.* 1995Mar.;(30)463-466.
10. Oliveira, E. A., Rabelo, E. A., Pereira, A. K., Diniz, J. S., Cabral, A. C., Leite, H. V., Silva, J. M., and Fagundes, T. A. Prognostic factors in prenatally-detected posterior urethral valves: a multivariate analysis. *Pediatr. Surg. Int.* 2002Dec.;(18)662-667.
11. Gasser, B., Mauss, Y., Ghnassia, J. P., Favre, R., Kohler, M., Yu, O., and Vonesch, J. L. A quantitative study of normal nephrogenesis in the human fetus: its implication in the natural history of kidney changes due to low obstructive uropathies. *Fetal Diagn. Ther.* 1993Nov.;(8)371-384.
12. Osathanondh, V. and Potter, E. L. Pathogenesis of polycystic kidneys. Historical Survey. *Arch. Pathol.* 1964May;(77)459-465.
13. Potter, E. L. Bilateral Absence of ureters and kidneys: A Report of 50 Cases. *Obstet. Gynecol.* 1965Jan.;(25)3-12.
14. Potter, E. L. and Craig J.M. *Pathology of the fetus and the infant.* 1976;(3rd)434-475.

15. El-Ghoneimi, A., Desgrippes, A., Luton, D., Macher, M. A., Guibourdenche, J., Garel, C., Muller, F., Vuillard, E., Lottmann, H., Nessmann, C., Oury, J. F., and Aigrain, Y. Outcome of posterior urethral valves: to what extent is it improved by prenatal diagnosis? *J.Urol.* 1999 Sept.;(162)849-853.
16. Sociedade Brasileira de Nefrologia. 2010;
17. Klahr, S., Ishidoya, S., and Morrissey, J. Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am.J.Kidney Dis.* 1995 July;(26)141-146.
18. Chevalier, R. L., Forbes, M. S., and Thornhill, B. A. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2009 June;(75)1145-1152.
19. Vaughan, E. D., Jr., Marion, D., Poppas, D. P., and Felsen, D. Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York. *J.Urol.* 2004 Dec.;(172)2563-2569.
20. Docherty, N. G., O'Sullivan, O. E., Healy, D. A., Fitzpatrick, J. M., and Watson, R. W. Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2006 Jan.;(290)F4-13.
21. Thornhill, B. A., Burt, L. E., Chen, C., Forbes, M. S., and Chevalier, R. L. Variable chronic partial ureteral obstruction in the neonatal rat: a new model of ureteropelvic junction obstruction. *Kidney Int.* 2005 Jan.;(67)42-52.
22. Thornhill, B. A., Forbes, M. S., Marcinko, E. S., and Chevalier, R. L. Glomerulotubular disconnection in neonatal mice after relief of partial ureteral obstruction. *Kidney Int.* 2007 Nov.;(72)1103-1112.
23. Chen, C. O., Park, M. H., Forbes, M. S., Thornhill, B. A., Kiley, S. C., Yoo, K. H., and Chevalier, R. L. Angiotensin-converting enzyme inhibition aggravates renal interstitial injury resulting from partial unilateral ureteral obstruction in the neonatal rat. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2007 Mar.;(292)F946-F955.
24. Oliver, J. A., Maarouf, O., Cheema, F. H., Martens, T. P., and Al-Awqati, Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J.Clin.Invest* 2004 Sept.;(114)795-804.

25. Abbate, M., Brown, D., and Bonventre, J. V. Expression of NCAM recapitulates tubulogenic development in kidneys recovering from acute ischemia. *Am. J. Physiol* 1999 Sept.;(277)F454-F463.
26. Wobus, A. M. and Boheler, K. R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*. 2005 Apr.;(85)635-678.
27. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., and Anversa, P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2001 Aug.;(98)10344-10349.
28. Theise, N. D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P. B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O., and Krause, D. S. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000 July;(32)11-16.
29. Eglitis, M. A., Dawson, D., Park, K. W., and Mouradian, M. M. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport* 1999 Apr.;(10)1289-1292.
30. Ferrari, G., Cusella-De, Angelis G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998 Mar.;(279)1528-1530.
31. Krause, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther*. 2002 June;(9)754-758.
32. Sessarego, N., Parodi, A., Podesta, M., Benvenuto, F., Mogni, M., Raviolo, V., Lituania, M., Kunkl, A., Ferlazzo, G., Bricarelli, F. D., Uccelli, A., and Frassoni, F. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Haematologica* 2008 Mar.;(93)339-346.
33. Cipriani, S., Bonini, D., Marchina, E., Balgkouranidou, I., Caimi, L., Grassi, Zucconi G., and Barlati, S. Mesenchymal cells from human amniotic fluid survive and migrate after transplantation into adult rat brain. *Cell Biol. Int.* 2007 Aug.;(31)845-850.
34. Rehni, A. K., Singh, N., Jaggi, A. S., and Singh, M. Amniotic fluid derived stem cells ameliorate focal cerebral ischaemia-reperfusion injury induced behavioural deficits in mice. *Behav. Brain Res.* 2007 Oct.;(183)95-100.
35. Pan, H. C., Cheng, F. C., Chen, C. J., Lai, S. Z., Lee, C. W., Yang, D. Y., Chang, M. H., and Ho, S. P. Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by

amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J. Clin. Neurosci.* 2007 Nov.;(14)1089-1098.

36. Sartore, S., Lenzi, M., Angelini, A., Chiavegato, A., Gasparotto, L., De, Coppi P., Bianco, R., and Gerosa, G. Amniotic mesenchymal cells autotransplanted in a porcine model of cardiac ischemia do not differentiate to cardiogenic phenotypes. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2005 Nov.;(28)677-684.
37. De, Coppi P., Callegari, A., Chiavegato, A., Gasparotto, L., Piccoli, M., Taiani, J., Pozzobon, M., Boldrin, L., Okabe, M., Cozzi, E., Atala, A., Gamba, P., and Sartore, S. Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. *J. Urol.* 2007 Jan.;(177)369-376.
38. Perin, L., Giuliani, S., Jin, D., Sedrakyan, S., Carraro, G., Habibian, R., Warburton, D., Atala, A., and De Filippo, R. E. Renal differentiation of amniotic fluid stem cells. *Cell Prolif.* 2007 Dec.;(40)936-948.
39. Kinomura, M., Kitamura, S., Tanabe, K., Ichinose, K., Hirokoshi, K., Takazawa, Y., Kitayama, H., Nasu, T., Sugiyama, H., Yamasaki, Y., Sugaya, T., Maeshima, Y., and Makino, H. Amelioration of cisplatin-induced acute renal injury by renal progenitor-like cells derived from the adult rat kidney. *Cell Transplant.* 2008;(17)143-158.
40. Hopkins, C., Li, J., Rae, F., and Little, M. H. Stem cell options for kidney disease. *J. Pathol.* 2009 Jan.;(217)265-281.
41. Barreira, A. L., Takiya, C. M., Castiglione, R. C., Maron-Gutierrez, T., Barbosa, C. M., Ornellas, D. S., Verdoorn, K. S., Pascarelli, B. M., Borojevic, R., Einicker-Lamas, M., Leite, M., Jr., Morales, M. M., and Vieyra, A. Bone marrow mononuclear cells attenuate interstitial fibrosis and stimulate the repair of tubular epithelial cells after unilateral ureteral obstruction. *Cell Physiol Biochem.* 2009;(24)585-594.
42. Ruano, R., Duarte, S., and Zugaib, M. Percutaneous laser ablation of sacrococcygeal teratoma in a hydropic fetus with severe heart failure--too late for a surgical procedure? *Fetal Diagn. Ther.* 2009;(25)26-30.
43. Ruano, R., Duarte, S. A., Pimenta, E. J., Takashi, E., da Silva, M. M., Tannuri, U., and Zugaib, M. Comparison between Fetal Endoscopic Tracheal Occlusion Using a 1.0-mm Fetoscope and

Prenatal Expectant Management in Severe Congenital Diaphragmatic Hernia. *Fetal Diagn. Ther.* 2010 Apr.;

44. Ruano, R., Duarte, S., Bunduki, V., Giron, A. M., Srougi, M., and Zugaib, M. Fetal cystoscopy for severe lower urinary tract obstruction--initial experience of a single center. *Prenat. Diagn.* 2010 Jan.;(30)30-39.
45. Yiee, J. and Wilcox, D. Management of fetal hydronephrosis. *Pediatr. Nephrol.* 2008 Mar.;(23)347-353.
46. Coplen, D. E., Austin, P. F., Yan, Y., Blanco, V. M., and Dicke, J. M. The magnitude of fetal renal pelvic dilatation can identify obstructive postnatal hydronephrosis, and direct postnatal evaluation and management. *J. Urol.* 2006 Aug.;(176)724-727.
47. Biard, J. M., Johnson, M. P., Carr, M. C., Wilson, R. D., Hedrick, H. L., Pavlock, C., and Adzick, N. S. Long-term outcomes in children treated by prenatal vesicoamniotic shunting for lower urinary tract obstruction. *Obstet. Gynecol.* 2005 Sept.;(106)503-508.
48. Kassem, M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells* 2004;(6)369-374.
49. Le, Blanc K. and Pittenger, M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy.* 2005;(7)36-45.
50. Kaviani, A., Perry, T. E., Dzakovic, A., Jennings, R. W., Ziegler, M. M., and Fauza, D. O. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *J. Pediatr. Surg.* 2001 Nov.;(36)1662-1665.
51. Kaviani, A., Guleserian, K., Perry, T. E., Jennings, R. W., Ziegler, M. M., and Fauza, D. O. Fetal tissue engineering from amniotic fluid. *J. Am. Coll. Surg.* 2003 Apr.;(196)592-597.
52. Duarte, S. A. Estudo das células mesenquimais do líquido amniótico em meio de cultura suplementado por soro fetal bovino ou humano. 2009;
53. Digirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., and Prockop, D. J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br. J. Haematol.* 1999 Nov.;(107)275-281.
54. Fehrer, C. and Lepperdinger, G. Mesenchymal stem cell aging. *Exp. Gerontol.* 2005 Dec.;(40)926-930.

55. Barry, F. P. and Murphy, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004 Apr.; (36) 568-584.
56. Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S. P., and Roberts, I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 2006 May; (20) 161-171.
57. Alhadlaq, A. and Mao, J. J. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev.* 2004 Aug.; (13) 436-448.
58. Bruder, S. P., Jaiswal, N., and Haynesworth, S. E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell Biochem.* 1997 Feb.; (64) 278-294.
59. Colter, D. C., Class, R., Digirolamo, C. M., and Prockop, D. J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 Mar.; (97) 3213-3218.
60. Javazon, E. H., Beggs, K. J., and Flake, A. W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp. Hematol.* 2004 May; (32) 414-425.
61. Deans, R. J. and Moseley, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* 2000 Aug.; (28) 875-884.
62. Conget, P. A. and Minguell, J. J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Physiol* 1999 Oct.; (181) 67-73.
63. Stute, N., Holtz, K., Bubenheim, M., Lange, C., Blake, F., and Zander, A. R. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp. Hematol.* 2004 Dec.; (32) 1212-1225.
64. Lakshmi pathy, U. and Verfaillie, C. Stem cell plasticity. *Blood Rev.* 2005 Jan.; (19) 29-38.
65. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 Apr.; (284) 143-147.
66. Campagnoli, C., Roberts, I. A., Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, I., and Fisk, N. M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001 Oct.; (98) 2396-2402.

67. Giuliani, S., Perin, L., Sedrakyan, S., Kokorowski, P., Jin, D., and De, Filippo R. Ex vivo whole embryonic kidney culture: a novel method for research in development, regeneration and transplantation. *J. Urol.* 2008 Jan.;(179)365-370.
68. Imasawa, T., Nagasawa, R., Utsunomiya, Y., Kawamura, T., Zhong, Y., Makita, N., Muso, E., Miyawaki, S., Maruyama, N., Hosoya, T., Sakai, O., and Ohno, T. Bone marrow transplantation attenuates murine IgA nephropathy: role of a stem cell disorder. *Kidney Int.* 1999 Nov.;(56)1809-1817.
69. Fang, T. C., Alison, M. R., Cook, H. T., Jeffery, R., Wright, N. A., and Poulson, R. Proliferation of bone marrow-derived cells contributes to regeneration after folic acid-induced acute tubular injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005 June;(16)1723-1732.
70. Cavaglieri, R. C., Martini, D., Sogayar, M. C., and Noronha, I. L. Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model. *Transplant. Proc.* 2009 Apr.;(41)947-951.
71. Perin, L., Giuliani, S., Jin, D., Sedrakyan, S., Carraro, G., Habibian, R., Warburton, D., Atala, A., and De Filippo, R. E. Renal differentiation of amniotic fluid stem cells. *Cell Prolif.* 2007 Dec.;(40)936-948.
72. Da, Sacco S., Sedrakyan, S., Boldrin, F., Giuliani, S., Parnigotto, P., Habibian, R., Warburton, D., De Filippo, R. E., and Perin, L. Human amniotic fluid as a potential new source of organ specific precursor cells for future regenerative medicine applications. *J. Urol.* 2010 Mar.;(183)1193-1200.
73. Matsell, D. G. and Tarantal, A. F. Experimental models of fetal obstructive nephropathy. *Pediatr. Nephrol.* 2002 July;(17)470-476.
74. Craig, J. C. Can ACE inhibitor therapy prevent end-stage renal failure? *Med. J. Aust.* 2001 Sept.;(175)276-
75. Chevalier, R. L., Thornhill, B. A., Forbes, M. S., and Kiley, S. C. Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy. *Pediatr. Nephrol.* 2010 Apr.;(25)687-697.
76. Ding, Y., Bushell, A., and Wood, K. J. Mesenchymal stem-cell immunosuppressive capabilities: therapeutic implications in islet transplantation. *Transplantation* 2010 Feb.;(89)270-273.

77. Poncelet, A. J., Denis, D., and Gianello, P. Cellular xenotransplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 2009Apr.;(14)168-174.
78. Humphreys, B. D. and Bonventre, J. V. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Annu. Rev. Med.* 2008;(59)311-325.
79. Togel, F. and Westenfelder, C. Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev. Dyn.* 2007Dec.;(236)3321-3331.
80. Chevalier, R. L., Kim, A., Thornhill, B. A., and Wolstenholme, J. T. Recovery following relief of unilateral ureteral obstruction in the neonatal rat. *Kidney Int.* 1999Mar.;(55)793-807.
81. Kellner, D., Chen, J., Richardson, I., Seshan, S. V., El, Chaar M., Vaughan, E. D., Jr., Poppas, D., and Felsen, D. Angiotensin receptor blockade decreases fibrosis and fibroblast expression in a rat model of unilateral ureteral obstruction. *J. Urol.* 2006Aug.;(176)806-812.
82. Semedo, P., Palasio, C. G., Oliveira, C. D., Feitoza, C. Q., Goncalves, G. M., Cenedeze, M. A., Wang, P. M., Teixeira, V. P., Reis, M. A., Pacheco-Silva, A., and Camara, N. O. Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury. *Int. Immunopharmacol.* 2009June;(9)677-682.
83. Fujihara, C. K., Noronha, I. L., Malheiros, Antunes, G. R., de, Oliveira, I., and Zatz, R. Combined mycophenolate mofetil and losartan therapy arrests established injury in the remnant kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000Feb.;(11)283-290.
84. Fujihara, C. K., Malheiros, D. M., Zatz, R., and Noronha, I. L. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int.* 1998Nov.;(54)1510-1519.
85. Morigi, M., Imberti, B., Zoja, C., Corna, D., Tomasoni, S., Abbate, M., Rottoli, D., Angioletti, S., Benigni, A., Perico, N., Alison, M., and Remuzzi, G. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004July;(15)1794-1804.
86. Lin, F., Cordes, K., Li, L., Hood, L., Couser, W. G., Shankland, S. J., and Igarashi, P. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003May;(14)1188-1199.
87. Togel, F., Weiss, K., Yang, Y., Hu, Z., Zhang, P., and Westenfelder, C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal

stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 2007 May; (292)F1626-F1635.