ANTONIO URT FILHO

TERAPIA COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS PROMOVE MELHORIAS E REESTABELECIMENTO DAS FUNÇÕES RENAIS EM MODELO PRÉ-CLÍNICO

CAMPO GRANDE

2015

ANTONIO URT FILHO

TERAPIA COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS PROMOVE MELHORIAS E REESTABELECIMENTO DAS FUNÇÕES RENAIS EM MODELO PRÉ-CLÍNICO

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Profª. Drª. Andreia C.M.B. Antoniolli Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

CAMPO GRANDE

2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANTONIO URT FILHO

TERAPIA COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS PROMOVE MELHORIAS E REESTABELECIMENTO DAS FUNÇÕES RENAIS EM MODELO PRÉ-CLÍNICO

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Profª. Drª. Andreia C.M.B. Antoniolli Silva

Aprovada em _____ de _____ de _____, pela Comissão Examinadora.

_____

Profª. Drª. Andreia C.M.B. Antoniolli Silva

_____

Prof. Dr. Wilson de Barros Cantero

_____

Prof. Dr. Marco Antônio Gonçalves

_____

Profª. Drª. Doroty Mesquita Dourado

_____

Prof. Dr. Roberto Antoniolli da Silva

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio e Ludy "*In Memorian*".

À minha esposa Thayse aos meus filhos Marcelo e Fernanda, presentes de Deus em minha vida, razão do meu afeto e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profª Drª Andréia Conceição Brochado Antoniolli Silva a qual aprendi a admirar e respeitar, pela paciência que teve nos momentos mais difíceis, pelo incentivo e fundamentalmente por acreditar em minha capacidade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira por todo seu empenho em me conduzir firme no objetivo a alcançar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste que através de toda dedicação de seus professores e funcionários possibilitou tornar este sonho realidade.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul por nos acolher e tornar possível a realização deste trabalho.

Oh! quão bom e quão suave é que os irmãos vivam em união.

(Salmos 133:1)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IRA	Insuficiência renal aguda
MO	Medula óssea
CTM	Células-tronco mesenquimal
CTM-MO	Células-tronco mesenquimal de medula óssea
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
PBS	Tampão fosfato-salino
DMEM	Dulbecco/Vogt modified Eagle's (Harry Eagle) Minimal Essential Medium
DAPI	Diagnóstico avançado por imagem
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
HGF	Fator de crescimento celular
IGF-1	Insulin-like growth factor)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
g	grama
mL	mililitro
rpm	rotação por minuto
cm^2	centímetro quadrado
^oC	grau celsius
CO^2	dióxido de carbono
mg	miligrama
kg	kilograma
µ	micro
µg	micro grama
+	mais
±	mais ou menos
<	menor que
>	maior que

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma ilustrando o delineamento experimental..... 17

Figura 2 - Fotomicrografia mostrando a presença de CTM-MO em rim, em momentos: 30 e 45 dias..... 21

Figura 3 – Aspectos das culturas em expansão clonal: A – Cultivo em fase inicial (20 dias), aumento 100x; B – Cultura com confluência superior a 80% (7 dias após a primeira passagem), aumento de 100x; C – Cultura em confluência superior a 80%, aumento de 400x..... 25

Figura 4 – Aspectos das culturas submetidas aos processos de diferenciação (aumento de 400x): A e C - Culturas de células indiferenciadas aderentes; B – Diferenciação osteogênica; D - Diferenciação adipogênica; E - Cultura de células indiferenciadas em *pellet*, corte histológico; F – Diferenciação condrogênica, corte histológico..... 26

Figura 5 – Marcação com DAPI (aumento 400x): 3A – Células tronco mesenquimais em suspensão marcadas com DAPI; 3B – Córtex renal sem infiltrado de CTM; 3C – Córtex renal com infiltrado de CTM 48 horas após o transplante..... 27

Figura 6-A - Fotomicrografia apresentando as lesões significantes em rim em Grupo Cisplatina e Grupo Cisplatina+CTM-MO em momentos 48 horas, 30 e 45 dias, em ratos..... 33

Figura 6-B - Fotomicrografia apresentando as lesões significantes em rim em Grupo Cisplatina e Grupo Cisplatina+CTM-MO em momentos 48 horas, 30 e 45 dias, em ratos..... 33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Taxa de uréia no sangue dos animais grupos sem e com cisplatino, 30 e 45 dias após a aplicação de cisplatino, em ratos. Mann-Whitney Test; (*) Significance< 0,05..... 29

Gráfico 2 - Taxa de creatinina no sangue dos animais em grupos sem e com cisplatina, 30 e 45 dias, em ratos. Teste Mann-Whitney; (*) Significância < 0,05..... 29

Grafico 3 - Taxa de uréia no sangue dos animais em grupo cisplatina e cisplatina+CTM-MO, em momentos: 30 e 45 dias. Teste Mann-Whitney; (*) Significância < 0,05..... 30

Gráfico 4 - apresentando a taxa de creatinina no sangue dos animais em grupo cisplatina e cisplatina+TM-MO e momentos de 30 e 45 dias. Teste Mann-Whitney; (*) Significância < 0,05..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados referentes análise de uréia e creatinina em Grupos Sem Cisplatino e Com Cisplatino em momentos: 48 horas, 30 e 45 dias, em ratos..... 28

Tabela 2 - Resultados referentes análise de uréia e creatinina em grupos cisplatina e cisplatina+CTM-MO em momentos: 30 e 45 dias, em ratos..... 30

Tabela 3 - Resultados em mediana referentes ao grau de alteração (0 a 3 +) em análise histológica em rim, grupos cisplatina e cisplatino+CTM-MO em momentos 48 horas, 30 e 45 dias em ratos..... 32

RESUMO

Filho AU. Cury RP. **A administração das células tronco mesenquimais ósseas promove uma significativa regeneração renal na insuficiência renal aguda, induzida pela cisplatina, em ratos.** Campo Grande; 2014. [Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso Sul].

Objetivo: estudar o efeito da terapia com células tronco mesenquimais em ratos submetidos a insuficiência renal aguda induzida por cisplatina. Métodos: para analisar os efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) em modelo animal com insuficiência renal aguda (IRA) induzida por cisplatina (injeção intraperitonal de 5 mg de cisplatina ¹/kg do peso corporal). Os ratos (N=59) foram distribuídos em 2 grupos: o grupo doador (n=10), recebeu uma única injeção intra peritonal de solução salina. O grupo experimental (n=49), após redistribuição em 07 subgrupos, administrou-se os tratamentos: Grupo R-I (n=7), controle, 30 dias; Grupo R-II, controle, 45 dias; Grupo R-III (n=7), injeção de cisplatina intraperitoneal (IP) com avaliação em 48 horas; Grupo R-IV (n=7) e R-V (n=7), injeção IP de cisplatina, com avaliação em 30 e 45 dias; Grupo R-VI (n=7) e R-VII (n=7), injeção IP de cisplatina + *CTM-MO*, com avaliação em 30 e 45 dias. Em grupos R-VI e R-VII administrou-se *CTM-MO* em momento de 48 horas após a injeção de cisplatina. A função renal foi analisada com dosagem sérica de ureia e creatinina. Avaliação histológica das lesões foi realizada por microscopia e análise com critérios da Classificação BANFF. Os resultados obtidos foram submetidos análise estatística, considerando-se como significante um valor de $p < 0,05$. Resultados: evidenciou-se melhora significativa da função renal com diminuição dos níveis de creatinina em dias 30 ($p = 0,002$) e 45 ($p < 0,001$), além de diminuição nos níveis de uréia em dias 30 ($p= 0<002$) e 45 ($p < 0,001$). Identificou-se melhora das lesões histológicas pós-administração de CTM-MO em dias 30 (proteína intratubular, $p=0,004$) e 45 (proteína intratubular, $p=0,004$; degeneração hidrópica tubular, $p<0,001$). Conclusão: administração de *CTM-MO* (células-tronco mesenquimais de medula óssea) em modelo animal submetido à lesão renal por cisplatina promoveu melhora significativa da função renal e de lesões histológicas.

Palavras-chave: Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos ; Células-Tronco; Células Estromais; Lesão Renal Aguda; Cisplatino; Regeneração.

ABSTRACT

Filho AU. Cury RP. **The administration of bone mesenchymal stem cells promotes a significant renal regeneration in acute renal failure induced by cisplatin in rats.** Campo Grande; 2014. [Doctorate thesis - Graduate Program in Health and Development in the Midwest Region of the Federal University of Mato Grosso do Sul].

Objective: Examine the effects of bone mesenchymal stem-cells injection in the renal function of a rat model submitted to cisplatin-induced acute kidney injury (AKI). Methods: **I**n order to investigate the effects of bone mesenchymal stem-cells injection (MB-MSCs) in a cisplatin-induced AKI rat model (intraperitoneal injection of 5 mg cisplatine/kg body weight; Fauldcispla LIBBS, Batch 12 G0702). Fifty-nine rats were divided into two main groups: donor (n=10) and experimental (n=49). The first group received a single intraperitoneal injection (IP) of saline and the MB-MSCs were extracted from them. The experimental group was subdivided into seven subgroups, each one containing seven rats: subgroups R-I, R-IV and R-V received single dose of IP cisplatin and were evaluated at days 2, 30 and 45, respectively. Subgroups R-II and R-III received IP cisplatin plus BM-MSCs injection and were evaluated at days 30 and 45, respectively; subgroups R-VI and R-VII were included as controls. Quantification of renal function was performed by serum analysis of BUN and creatinine. Evaluation of the histological damage by optical microscopy. Statistical analysis was performed and a p value < 0,05 was considered significant. Results: Significant improvement of the renal function was observed with reduction of creatinine at days 30 (p = 0,002) and 45 (p < 0,001), along with BUN reduction at days 30 (p= 0<002) and 45 (p < 0,001). Improvement of histological lesions MSCs was observed at day 30 (intra-tubular protein, p=0,004) and at day 45 (intratubular protein, p=0,004; tubular dropsical degeneration, p < 0,001). Conclusion: Administration of BM-MSCs stem cells (bone marrow stromal cells) for renal repair after cisplatine-induced acute kidney injury in rats showed a significant improvement of renal function and histological lesions.

Key words: Cell Therapy; Stem cells; Stromal Cells; Acute Kidney Injury; Cisplatin; Regeneration.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 14

2 OBJETIVOS..... 16
2.1 Objetivo geral..... 16
2.2 Objetivos específicos..... 16

3 MATERIAIS E MÉTODO..... 17
3.1 Materiais..... 17
3.2 Método..... 17
3.3 Tratamento de animais..... 18
3.4 Determinação da função renal..... 18
3.5 Protocolo de isolamento de CTM-MO..... 18
3.6 Preparo de CTM-MO..... 19
3.7 Expansão clonal CTM-MO 20
3.8 Preparação do material para transplante..... 20
3.9 Caracterização de CTM-MO..... 21
3.10 Diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica..... 21
3.11 Transplante das CTM-MO..... 23
3.12 Eutanásia..... 22
3.13 Processamento histológico..... 22
3.14 Histologia renal..... 23
3.15 Análise estatística..... 23

4 RESULTADOS..... 25
4.1 A expansão clonal das CTM-MO..... 25
4.2 As CTM-MO diferenciam-se em células osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas *in vitro*..... 25
4.3 A localização e a migração das CTM-MO..... 26
4.4 Análise da função renal..... 27
4.5 Histologia renal pós-infusão de cisplatina e CTM-MO..... 31

5 DISCUSSÃO..... 34

6 CONCLUSÃO..... 38

REFERÊNCIAS..... 39

APÊNDICE 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP..... 46

1 INTRODUÇÃO

A insuficiência renal aguda (IRA) caracteriza-se pela lesão tubular aguda com rápida perda da função renal. A IRA representa um problema de saúde pública e a terapia com base em células-tronco mesenquimal (CTM-MO) surge como alternativa de tratamento, ao promover a reversão de lesões às células epiteliais tubulares após insultos isquêmicos agudos ou tóxicos (MORIGI; De COPPI, 2014).

Apoptose (GONZALES et al., 2001) das células renais induzida pela cisplatina foi detectada tanto *in vivo* (LIU; BALIGA, 2003) quanto *in vitro* (LIEBERTHAL et al., 1996) e a toxicidade (CEPEDA et al., 2007) resultante da administração de cisplatina é conhecida. A cisplatina e outros derivados da platina são os agentes quimioterápicos mais amplamente usados no tratamento de tumores sólidos, incluindo os de ovário, cabeça e pescoço, os tumores das células embrionárias testiculares, entre outros. Uma complicação já conhecida da administração de cisplatina é a lesão aguda dos rins (OZKOK; EDELSTEIN, 2014), resultante de estresse oxidativo como parte do mecanismo indutor de toxicidade (CHIRINO; PEDRAZA-CHAVERRI, 2009).

O rim é um órgão diferenciado de baixa regeneração com diferentes tipos de linhagem celular; no entanto, a identidade das células tronco e células progenitoras do rim com potencial nefrogênico e seus nichos preferidos é desconhecida e ainda objeto de discussão. Células endógenas ou exógenas de diferentes fontes foram testadas em roedores com reperfusão isquêmica, lesão renal grave ou doença crônica (AGGARWAL et al., 2013).

Entende-se que as células tronco mesenquimal da medula óssea contribuem no *turnover* do parênquima renal e regeneração através de células-tronco mesenquimal, em virtude de suas propriedades de regeneração da estrutura tubular renal, com melhora da função renal durante IRA experimental e assim, oferecendo oportunidade de uso terapêutico (MORIGI et al., 2006). Existem mecanismos responsáveis pelos efeitos renoprotetores do CTM-MO sobre a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina: a trans diferenciação ou através de processo paracrino (MORIGI et al., 2004; YOKOO et al., 2005). Outros estudos têm demonstrado que o CTM-MO serve como proteção contra lesões tubulares graves por meio de um

processo independente de diferenciação (TÖGEL et al., 2005; DUFFIELD et al., 2005). Há resultados indicativos de que as células da medula óssea contribuem tanto para a volta normal do epitélio renal como também para sua regeneração após o dano, o que sugere potencial terapêutico (POULSOM et al., 2001). Há crescentes evidências de que células adultas da medula óssea (MO) exibam uma plasticidade inesperada e que possam se transformar numa grande quantidade de células diferenciadas. No caso de células renais glomerulares intrínsecas, há relatos de que as células derivadas de MO se dividem em células mesangiais e em podócitos. As células progenitoras endoteliais originadas da medula óssea participam da volta da célula endotelial glomerular após dano grave. O tratamento com células progenitoras endoteliais originadas da medula óssea pode estimular a angiogênese em áreas de lesões glomerulares progressivas, podendo ser usado como uma terapia promissora na prevenção de doenças renais terminais (IKARASHI et al., 2005).

Investigou-se se as CTM-MO contribuem para repovoar o *pool* das células-tronco do rim e resultados indicam que podem promover o crescimento de células que compartilham propriedades da célula-tronco do rim (JIA et al., 2012).

Com base nas evidências existentes do potencial terapêutico das CTM-MO, o objetivo deste estudo é avaliar a função renal e as alterações histológicas após IRA promovido pela cisplatina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito das células-tronco mesenquimais em modelo de insuficiência renal aguda, em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a histologia da morfologia renal.
- Avaliar a bioquímica da função renal.

3 MATERIAIS E MÉTODO

Experimento 1

3.1 Materiais

O experimento foi executado de acordo com o Guia Universitário para o Cuidado e Uso de Animais em Laboratório da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Todos os procedimentos usando animais foram aprovados pelo Comitê de Cuidados e Usos de Animais da UFMS (CEUA-UFMS 499/2012).

Amostra: O experimento utilizou ratos Wistar machos (N=59) oriundos do Biotério Central da UFMS, linhagem EP-1 e que foram distribuídos em Grupo Doador (n=10) e Experimental (n=49), sendo este subdividido em 7 subgrupos (R-I a R-VII) (Figura 1).

3.2 Métodos

Delineamento.

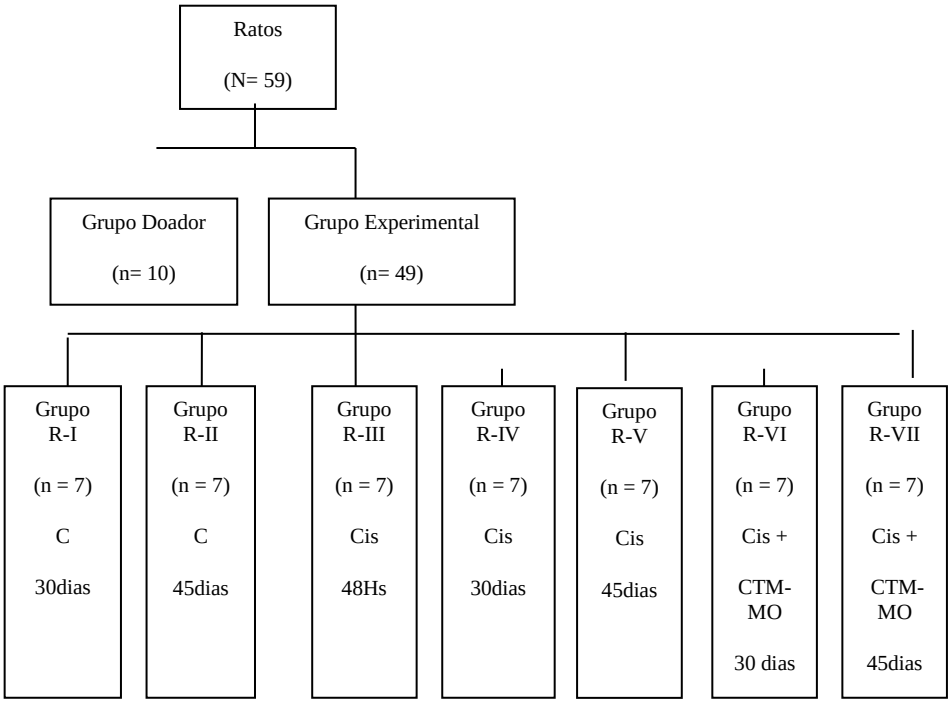


Figura 1 – Fluxograma ilustrando o delineamento experimental.

3.3 Tratamento de animais

Ratos Wistar machos (peso médio 300 gramas) foram usados nos experimentos. Durante os experimentos, os animais eram alojados sob condições padronizadas com um ciclo de 12 horas de claridade e 12 horas de escuro, com uma temperatura média de 22±2°C e umidade de 55%±1 em estante ventilada (AESLO). Água e alimento eram fornecidos *ad libidum*. Para investigar os efeitos das células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) no modelo animal, induziu-se insuficiência renal aguda (IRA) com uso da cisplatina (injeção intraperitonal de 5 mg de cisplatina[1]/kg do peso corporal; *Fauldcispla* LIBBS, Lote 12GO702). Os ratos (N=59) foram distribuídos em 2 grupos: o grupo doador (n=10), recebeu uma única injeção intra peritonal de solução salina. O grupo experimental (n=49), após redistribuição em 07 subgrupos, administrou-se os tratamentos: Grupo R-I (n=7), controle, 30 dias; Grupo R-II, controle, 45 dias; Grupo R-III (n=7), injeção de cisplatina intraperitoneal (IP) com avaliação em 48 horas; Grupo R-IV (n=7) e R-V (n=7), injeção IP de cisplatina, com avaliação em 30 e 45 dias; Grupo R-VI (n=7) e R-VII (n=7), injeção IP de cisplatina + CTM-MO, com avaliação em 30 e 45 dias. Em grupos R-VI e R-V-II administrou-se CTM-MO (1 x 106 células/500 ul, via injeção na veia da cauda, em momento de 48 horas após a injeção de cisplatina).

3.4 Determinação da função renal

Níveis séricos de creatinina (Método Javé), uréia (método Urease U.V.) foram mensurados usando kits de diagnóstico padrão em autoanalisador (Roche, COBAS).

3.5 Protocolo de isolamento de CTM-MO

As células da cultura primária foram coletadas da medula óssea de fêmures em 10 ratos Wistar do grupo doador. Em fluxo laminar, as epífises ósseas foram cortadas liberando o lúmen intra-ósseo, expondo a medula óssea do fêmur e isoladas conforme protocolo CETROGEN: lavar a MO com PBS estéril; resuspender

a *pellet* em 5mL de PBS estéril; centrifugar o material por 2 minutos a 940g (1900rpm); resuspender a *pellet* em 5mL de PBS estéril; centrifugar o material por 2 minutos a 940g (1900rpm); resuspender o pellet em 5mL de PBS estéril; centrifugar o material por 2 minutos a 940g (1900rpm); resuspender o pellet em 4mL de DMEM-Low glucose; em um tubo contendo 4mL de Histopaque adicionar delicadamente 4mL do meio contendo o material biológico; centrifugar por 30 minutos a 440g (1300rpm); coletar a fração mononuclear (fase entre o Histopaque e o meio de cultura); resuspender a fração mononuclear em 5mL de PBS; centrifugar o material por 5 minutos a 940g (1900rpm); resuspender o pellet em 5mL de PBS; centrifugar o material por 5 minutos a 940g (1900rpm); resuspender o pellet em 5mL de PBS; centrifugar o material por 5 minutos a 940g (1900rpm); resuspender o pellet em 5mL de PBS; centrifugar o material por 5 minutos a 940g (1900rpm); resuspender o pellet em 5mL de PBS; centrifugar o material por 5 minutos a 940g (1900rpm); resuspender o pellet em 10mL de DMEM-Low glucose suplementado a 10% e transferir para um frasco de cultura de 25cm^2.

3.6 Preparação de CTM-MO

Quando o crescimento celular atingiu cerca de 70% de confluência foi realizada a tripsinização, avaliação da viabilidade celular, por azul de tripan (1:1 de solução contendo as células-tronco e azul de tripan - Gibco®), contagem e posterior repique para outros frascos de cultivo para expansão clonal. As células foram mantidas em processo de expansão clonal até atingirem cerca de 4,0x10^6 células. Logo a seguir, as células foram tripsinizadas - conforme descrito anteriormente - e o pellet resuspenso em 1mL de PBS. As células foram avaliadas quanto a viabilidade e a seguir, diluídas em PBS na concentração de 1,0x10^6 células (MONTEIRO et al., 2009) as quais foram transferidas aos animais experimentais submetidos a terapia celular.

3.7 Expansão clonal CTM-MO

Cada vez que os frascos atingiam confluência mínima de 70%, o meio de cultura das garrafas de cultivo era descartado com auxilio de uma pipeta Pasteur e uma bomba de sucção a vácuo. Após retirada total do meio de cultivo por sucção; células foram lavadas com 3mL de PBS por 3 (três) vezes, acrescentando PBS suplementado com 1% PE, homogeneizando, e sugado todo PBS novamente. A seguir, as células aderidas ao fundo da garrafa foram tripsinizadas com solução de tripsina 0,25% e incubadas a 37°C em 5% de CO^2 e umidade de 95% durante no máximo, 5 minutos. Posteriormente, as células passaram por um processo de neutralização da enzima com 5mL de meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%) e a suspensão contendo as células-tronco foi transferida para tubo cônico para posterior centrifugação por 5 minutos à 200 rpm. O sobrenadante foi totalmente descartado e o *pellet* resuspenso em 1 mL de DMEM suplementado com Soro Fetal Bovino a 2% PE. Uma alíquota de 10pL de solução foi acrescida a 10pL de Azul de Tripan e levemente homogeneizada com auxilio de uma micropipeta. Essa solução foi utilizada para avaliação da viabilidade celular em câmara de Neubauer, conforme preconizado por Meirelles e Nardi (2003) e Bittencourt et al. (2006). O restante da suspensão celular foi transferido para um novo frasco de cultivo até a obtenção do numero de células necessárias para a terapia celular.

3.8 Preparação do material para transplante

As células foram mantidas em processo de expansão clonal até atingirem cerca de $4{,}0x10^6$ células. A seguir as células foram tripsinizadas conforme protocolo (MONTEIRO et al., 2009) e o *pellet* foi resuspenso em 1mL de PBS. As células foram avaliadas quanto à viabilidade celular e logo em seguida foram diluídas em PBS na concentração de $1{,}0x10^6$ células conforme protocolo em ratos (MONTEIRO et al., 2009) as quais foram transferidas aos animais do experimento conforme delineamento.

3.9 Caracterização de CTM-MO

Execução de procedimento conforme protocolo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole (LIN et al., 2013) e visibilização da expressão de CTM-MO em rim, momentos 30 e 45 dias, Figura 2).

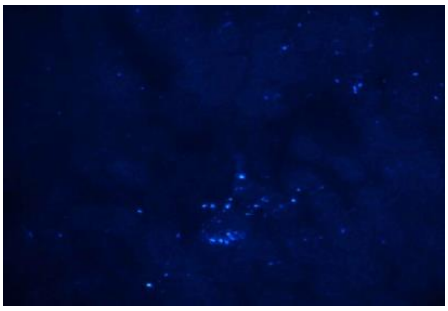
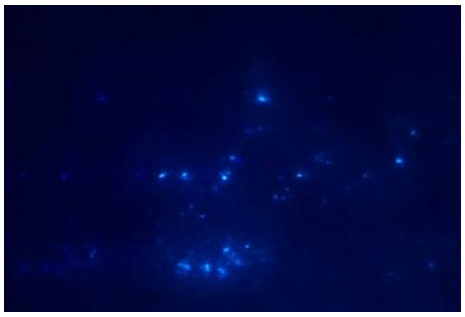
Método	Grupo Cisplatine+CTM-MO	
	30 dias	45 dias
		
Coloração DAPI - Fluorescência em células CTM-MO em rim.		

Figura 2 - Fotomicrografia mostrando a presença de CTM-MO em rim, em momentos: 30 e 45 dias.

3.10 Diferenciação Osteogênica, Adipogênica e Condrogênica

Os frascos destinados aos experimentos de diferenciação, quando atingiram a confluência de 80%, foram novamente tripsinizados como descritos anteriormente e as células foram semeadas em 4 frascos de 25cm^2, na concentração de 2x10^5 células, e em dois tubos cônicos de 15ml, na concentração de 1x10^6 células. Dois frascos de 25cm^2 e um tubo cônico, utilizados como controles, foram mantidos em meio de cultura suplementado. Para a diferenciação adipogênica e osteogênica, as células foram mantidas por 24 horas em meio de cultura suplementado. Em seguida, esse foi substituído por meio de cultura STEMPRO Osteogenesis e Adipogenic Differentiation Kit (Invitrogen®), respectivamente, e mantidas em cultura por 14 dias, com trocas duas vezes por semana. Para diferenciação condrogênica as células foram mantidas em meio suplementado por duas horas. Em seguida, o mesmo foi substituído por meio de cultura STEMPRO Condrogenesis Differentiation Kit (Invitrogen®), com trocas duas vezes por semana, sendo a cultura mantida por 21

dias. Após o período de cultivo, os meios foram descartados e as células fixadas em paraformaldeído por 1 hora. Para diferenciação adipogênica utilizou-se a coloração Oil Red O. Para a diferenciação osteogênica utilizou-se a coloração de Alizarina Red. Já para a diferenciação condrogênica o *pellet* foi submetido à rotina histológica convencional e corado por azul de Toluidina (HERMETO et al., 2015).

3.11 Transplante das CTM-MO

Após 48 horas da administração de cisplatina, os animais de Grupos R-VI e R-VII receberam suspensão de CTM-MO através de injeção na veia caudal em quantidade de $1,0X10^6$ células por animal (MONTEIRO et al., 2009). Para o procedimento, os animais foram anestesiados com Ketamina (50mg/Kg, p.c.) e Xilasina (10mg/Kg, p.c.) administrados por via intraperitoneal, na dose 0,8ml/kg (i.p.).

3.12 Eutanásia

Animais foram submetidos à eutanásia em momentos de 48 horas, 30 e 45 dias pós-administração de cisplatina com administração de tiopental em dose de 150 mg/kg peso via intraperitoneal e a seguir coleta de rim.

3.13 Processamento histológico

Amostras de rim fixados em formol tamponado a 10% e tecidos foram cortados em espessura de 4-µm. Utilizado técnica histológica padrão e coloração com hematoxilina-eosina (H&E) e tricômico de Masson. As secções foram analisadas pelo patologista com uso de microscopia óptica (Microscope Nikon E200 de x100). O profissional não tinha conhecimento prévio sobre a pesquisa em cada lâmina.

3.14 Histologia renal

Análise executada em microscopia óptica, magnificação de x400 e análise de lesões teciduais conforme os critérios da Classificação BANFF: (RACUSEN et al., 1999) Tubulite: infiltrado linfocitário intratubular (necrose e substituição por fibrose não avaliados); 2) Degeneração Hidrópica tubular: balanonização citoplasmática das células do túbulo contorcido proximal (1+<25%; 2+25–75%; 3+>75%); 3) Proteína intratubular: presença de material eosinofílico dentro dos túbulos (contorcido proximal, distal, alça de Henle) – falência da filtração glomerular. Falência de reabsorção tubular (1+<25%; 2+25–75%; 3+>75%); 4) Glomerulite: infiltrado linfocitário no glomérulo; 5) Arterite infiltrado linfocitário nas arteríolas; 6) Infiltrado Intersticial: linfócitos no interstício (1+0–25%; 2+25–75%; 3+>75%); 7) Fibrose Intersticial: Deposição de colágeno “cicatricial”; 8) Esclerose Glomerular: Fibrose de glomérulos (=falência do néfron); 9) Calcificações; 10) Retração/Atrofia Cortical: Substituição parcial do parênquima Renal por Fibrose e/ou infiltrado inflamatório; 11) Apoptose/Necrose tubular: Degeneração total ou parcial dos túbulos (1+<25%; 2+25–75%; 3+>75%); 12) Necrose Global: Glomérulos e túbulos envolvidos.

3.15 Análise estatística

A comparação entre o grupo experimental sem cisplatina e o grupo experimental com cisplatina, bem como entre o grupo cisplatina e o grupo cisplatina+CTM-MO, em relação às variáveis taxa de uréia, creatinina e histologia foi realizado por meio do teste de Mann-Whitney. O mesmo teste foi utilizado na comparação entre os momentos 30 e 45 dias, em relação a taxa de uréia e a taxa de creatinina. A comparação entre os grupos de 48 horas, sem e com cisplatina, em relação a uréia e creatinina, análise executada com uso teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Os demais resultados deste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SigmaPlot, versão 12.5, considerando um nível de significância de 5% (SHOTT, 1990).

Experimento 2 - Localização e Migração das Células Tronco Mesequimais

Animais, Delineamento e Condições Experimentais

Foram utilizados 6 ratos Wistar, machos e sexualmente maduros, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CCBS/UFMS). Divididos em dois grupos experimentais (n = 4): GIRA e GIRA+CTM. Os animais foram avaliados 48 horas após o transplante das CTM marcada com DAPI. As condições de manutenção dos animais, determinação da função renal, confirmação da insuficiência renal aguda, anestesia, eutanásia, isolamento, expansão clonal e transplante das células tronco mesenquimais foram realizados da mesma forma como descrito no Experimento 1. No entanto, antes do transplante as CTM foram incubadas com marcador nuclear 4’6-diamidino-2-phenylindole,dihydrochloride (DAPI, Life Technologies®) na concentração de 10µg/mL a 37ºC por 30 minutos na ausência de luz.

Análise Histológica em Fluorescência

Após a eutanásia os animais tiveram os seus rins coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, os mesmos foram fixados em suporte com meio de inclusão para criostato (EasyPath®) e cortes de 5µm foram realizados à temperatura -10ºC na ausência de luz. O corte foi posicionado em lâmina e analisado em microscopia de fluorescência, em aumento de 400x, com filtro DAPI (EX D350/50x; DM 400DCLP; BA D460/50m) em microscópio de fluorescência (BA410 FL).

4 RESULTADOS

4.1 A expansão clonal das CTM-MO

As CTM após isoladas foram submetidas ao protocolo de expansão clonal com sucessivos repiques. Em todas as passagens foram mantidas somente culturas com viabilidade superior a 95% e os aspectos das culturas utilizadas no experimento podem ser observados na Figura 3.

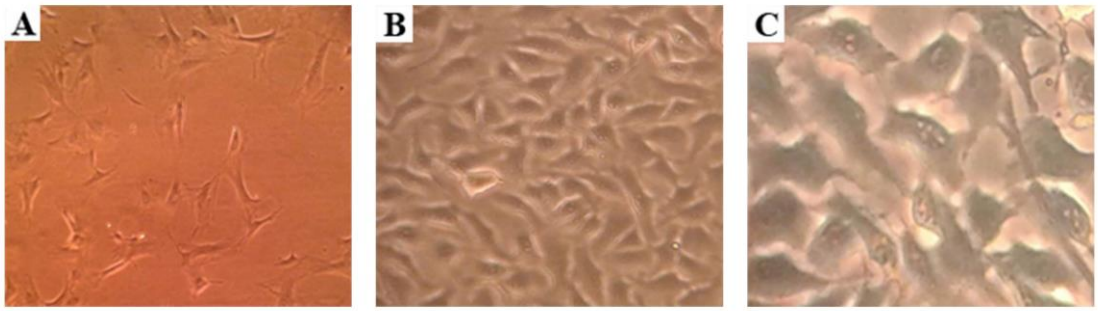


Figura 3 – Aspectos das culturas em expansão clonal: A – Cultivo em fase inicial (20 dias), aumento 100x; B – Cultura com confluência superior a 80% (7 dias após a primeira passagem), aumento de 100x; C – Cultura em confluência superior a 80%, aumento de 400x.

4.2 As CTM-MO diferenciam-se em células osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas *in vitro*

As CTM, obtidas da medula óssea dos ratos doadores, foram induzidas à diferenciação e as modificações morfológicas características destes tipos celulares foram observadas. A Figura 4 demonstra imagens representativas do controle das células indiferenciadas cultivadas em superfície aderente (2A e 2C) e a diferenciação osteogênica (2B) e adipogênica (2D), validadas pela coloração com Alizarin Red, que mostra os depósitos de cálcio corados em vermelho nas células diferenciadas; e pela coloração com Oil Red, que evidencia as vesículas de gordura e vacúolos característicos das células adipogênicas. Em seguida, estão apresentadas as células indiferenciadas cultivadas em *pellet* (2E) e a diferenciação condrogênica (2F), coradas pelo Azul de Toluidina que permite evidenciar o aumento da deposição de matriz celular produzida pelos condrócitos diferenciados.

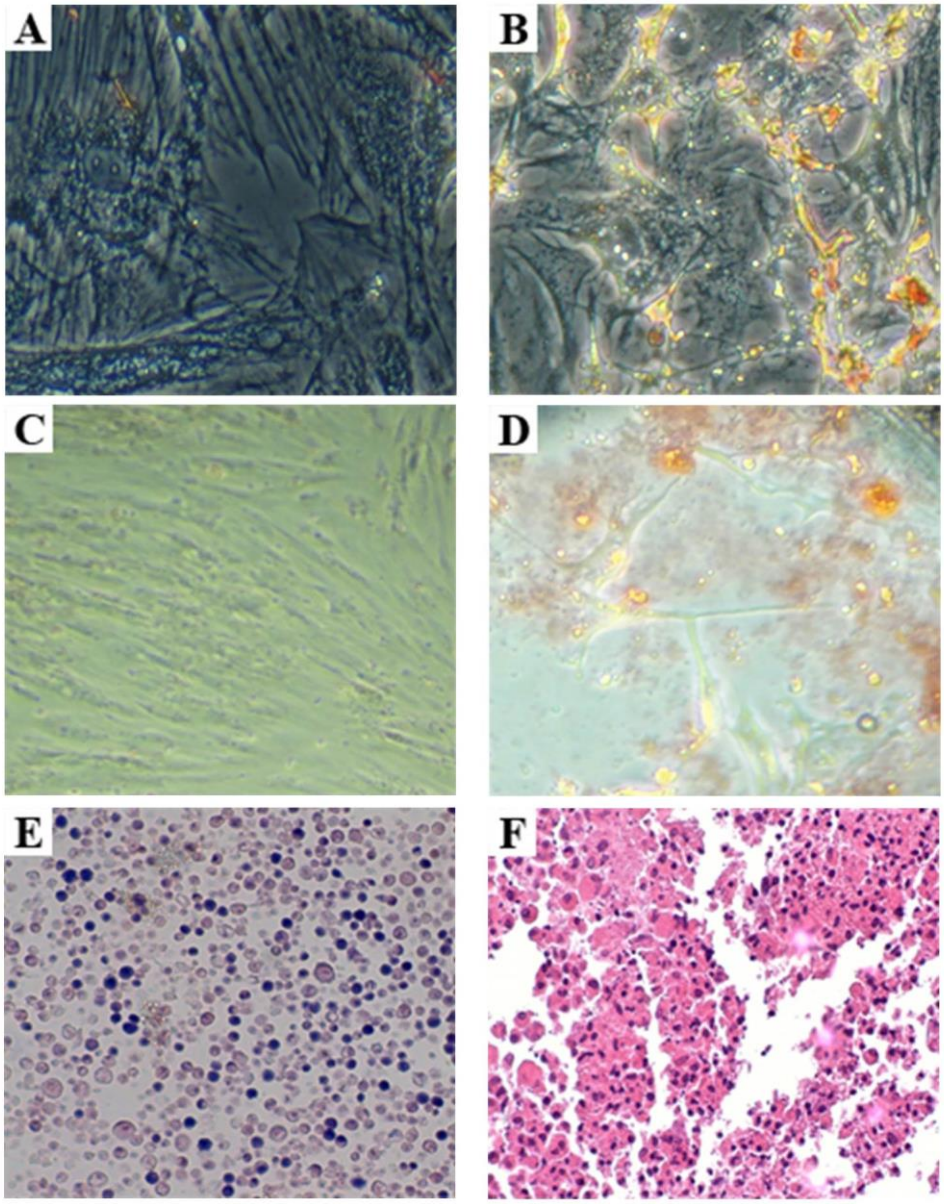


Figura 4 – Aspectos das culturas submetidas aos processos de diferenciação (aumento de 400x): A e C - Culturas de células indiferenciadas aderentes; B – Diferenciação osteogênica; D - Diferenciação adipogênica; E - Cultura de células indiferenciadas em *pellet*, corte histológico; F – Diferenciação condrogênica, corte histológico.

4.3 Localização e a migração das CTM-MO

As CTM marcadas com DAPI confirmaram a migração pela corrente sanguínea até os rins. A localização das CTM pode ser confirmada por microscopia de fluorescência. Na Figura 5 observa-se as CTM marcadas em suspensão (A), o córtex renal sem infiltrado de CTM (B) e o córtex renal com a presença de CTM marcadas com DAPI (C).

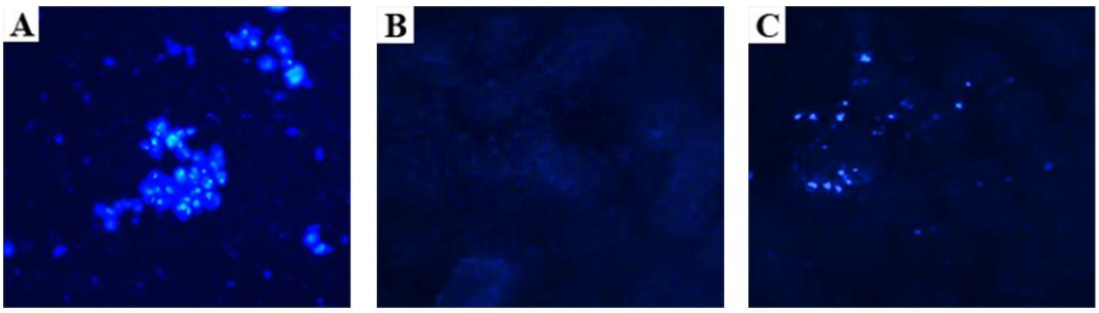


Figura 5 – Marcação com DAPI (aumento 400x): 3A – Células tronco mesenquimais em suspensão marcadas com DAPI; 3B – Córtex renal sem infiltrado de CTM; 3C – Córtex renal com infiltrado de CTM 48 horas após o transplante.

4.4 Análise da função renal

Os resultados referentes à taxa de uréia e creatinina no sangue dos animais dos grupos que receberam ou não cisplatina, nos momentos 30 e 45 dias estão apresentados na Tabela 1 e ilustrados nos Gráficos 1 e 2, respectivamente. O tratamento dos animais com cisplatina promoveu um aumento significativo na taxa de uréia no sangue dos animais, sendo este aumento verificado tanto aos 30 dias (teste de Mann-Whitney, p=0,002) como aos 45 dias (p<0,001) após a aplicação da droga. Aos 30 dias, a taxa de uréia passou de 47,43±1,54 mg/dl (M ±DP) para 213,29±63,23 mg/dl. Aos 45 dias, a taxa de uréia passou de 44,14±4,36 mg/dl para 90,57±10,56 mg/dl. Além disso, aos 45 dias, a taxa de uréia nos animais tratados com cisplatina foi significativamente menor do que aquela observada aos 30 dias (p<0,001), todavia, com valores ainda maiores do que aqueles dos animais do grupo sem cisplatina. O mesmo foi observado em relação à creatinina, com valores maiores nos animais tratados com cisplatino em comparação àqueles sem cisplatina, tanto aos 30 dias (p=0,004) quanto aos 45 dias (p<0,001). Aos 30 dias, a taxa de cisplatina passou de 1,59±0,26 mg/dl para 0,53±0,05 mg/dl, enquanto que aos 45 dias ela passou de 1,89±0,40 mg/dl para 0,53±0,04 mg/dl. Da mesma forma que para ureia, aos 45 dias, a taxa de creatinina nos animais tratados com cisplatina foi significativamente menor do que aquela observada aos 30 dias (p<0,001), porém, com valores ainda maiores do que aqueles dos animais do grupo sem cisplatina.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados referentes à taxa de uréia e creatinina no sangue dos animais dos grupos que receberam cisplatina, sem ou com CTM-MO, nos momentos 30 e 45 dias. O tratamento com células tronco reduziu significativamente a taxa de uréia nos animais, tanto aos 30 (teste de Mann-Whitney, *p*=0,026) como aos 45 dias (*p*<0,001), sendo que não foi observada diferença entre os momentos 30 e 45 dias, em relação à taxa de uréia, para ambos os grupos (cisplatino: p=0,383; cisplatino+CTM-MO: p=1,000). Aos 30 dias, a taxa de uréia passou de 169,43±33,27 mg/dl para 59,14±4,53 mg/dl. Aos 45 dias, a taxa de uréia passou de 218,00±64,42 mg/dl para 52,57±1,19 mg/dl. O mesmo foi observado em relação à taxa de creatinina no sangue dos animais, onde o tratamento com CTM-MO diminuiu a taxa de creatinina tanto aos 30 (*p*=0,002) como aos 45 dias (*p*<0,001). No caso da creatinina, aos 30 dias, a taxa passou de 1,59±0,26 mg/dl nos animais apenas tratados com cisplatina, para 0,53±0,05 mg/dl nos animais tratados com cisplatina+CTM-MO. Aos 45 dias, a taxa de creatinina passou de 1,89±0,40 mg/dl nos animais apenas tratados com cisplatina, para 0,53±0,04 mg/dl nos animais tratados com cisplatina+CTM-MO. Também para creatinina não foi observada diferença entre os momentos 30 e 45 dias, tanto para o Grupo cisplatina (*p*=1,000), quanto para o Grupo cisplatina+CTM-MO (*p*=0,902). Estes resultados estão ilustrados nos Gráficos 3 e 4, respectivamente.

Tabela 1 - Resultados referentes análise de uréia e creatinina em Grupos Sem Cisplatino e Com Cisplatino em momentos: 48 horas, 30 e 45 dias, em ratos.

Bio	**Grupo Sem Cisplatina**			**Grupo Com Cisplatina**			**Valor de *p***		
	(A) 48Hs	**30d**	**45d**	**(B) 48Hs**	**30d**	**(C) 45d**	**48Hs[£]**	**30d**	**45d**
Ureía	43,43 ±4,07	47,43 ±1,54	44,14 ±4,36	218,00 ±64,42	218,00 ±64,42	169,43 ±33,27	0,004* (BeC>A)	<0,001*	0,002*
Creatinina	0,40 ±0,00	0,40 ±0,00	0,40 ±0,00	1,89 ±0,26	1,89 ±0,40	1,59 ±0,26	<0,001* (BeC>A)	0,004*	<0,001*

Teste Mann-Whitney; (*) Significância < 0,05. [£] Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de Dunn.

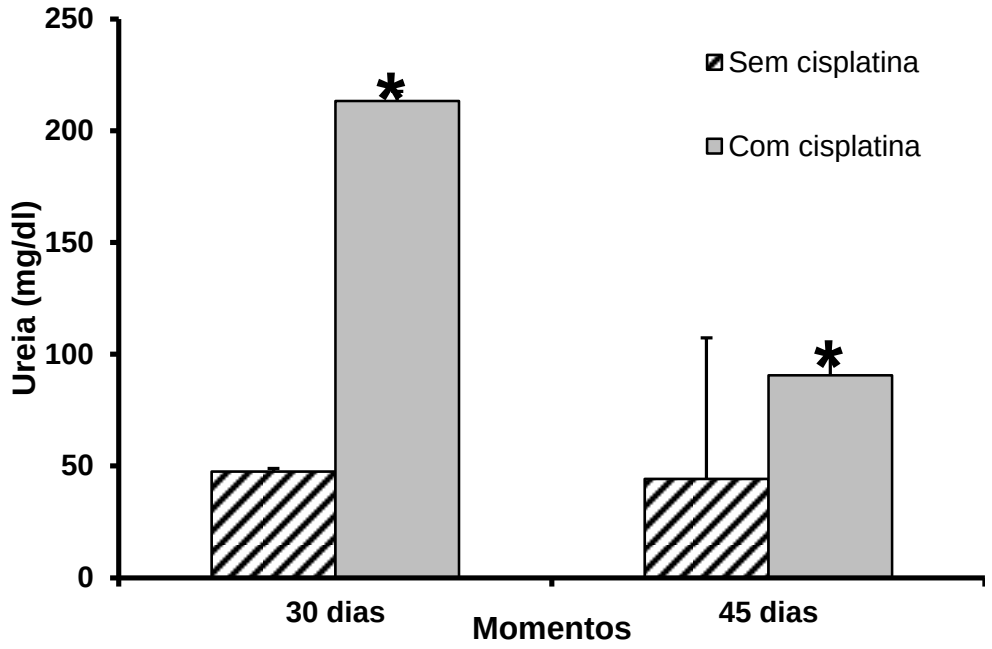


Gráfico 1 - Taxa de uréia no sangue dos animais grupos sem e com cisplatino, 30 e 45 dias após a aplicação de cisplatino, em ratos. Mann-Whitney Test; (*) Significance< 0,05.

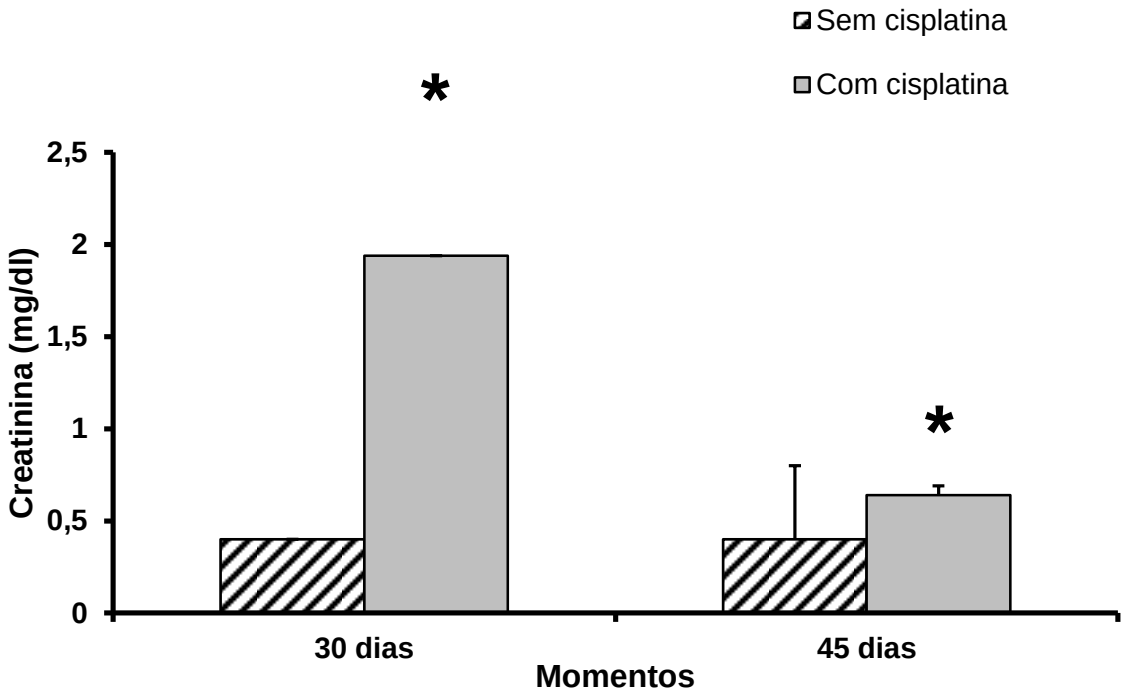


Gráfico 2 - Taxa de creatinina no sangue dos animais em grupos sem e com cisplatina, 30 e 45 dias, em ratos. Teste Mann-Whitney; (*) Significância < 0,05.

Tabela 2 - Resultados referentes análise de uréia e creatinina em grupos cisplatina e cisplatina+CTM-MO em momentos: 30 e 45 dias, em ratos.

Bioquímica	Grupo Cisplatina		Grupo Cisplatina+CTM-MO		*p* valor	
	30 dias	45 dias	30 dias	45 dias	30 dias	45 dias
Uréia	218,00 ±64,42	169,43 ±33,27	59,14 ±4,53	52,57 ±1,19	0,026*	<0,001*
Creatinina	1,89 ±0,40	1,59 ±0,26	0,53 ±0,05	0,53 ±0,04	0,002*	<0,001*

Teste Mann-Whitney; (*) Significância < 0,05.

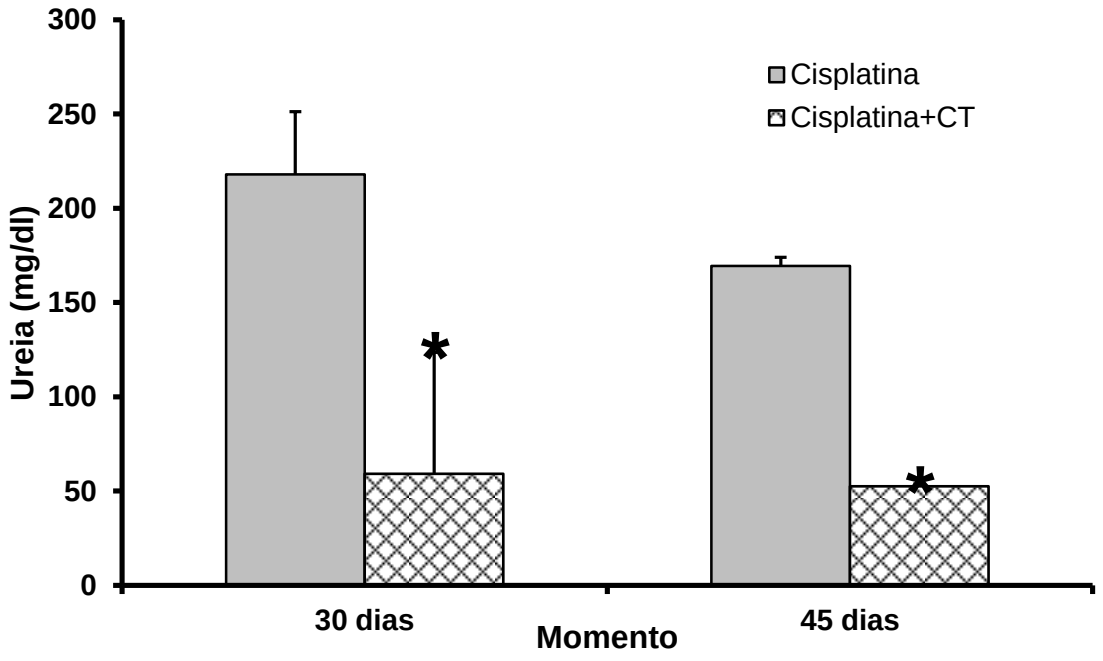


Grafico 3 - Taxa de uréia no sangue dos animais em grupo cisplatina e cisplatina+CTM-MO, em momentos: 30 e 45 dias. Teste Mann-Whitney; (*) Significância < 0,05.

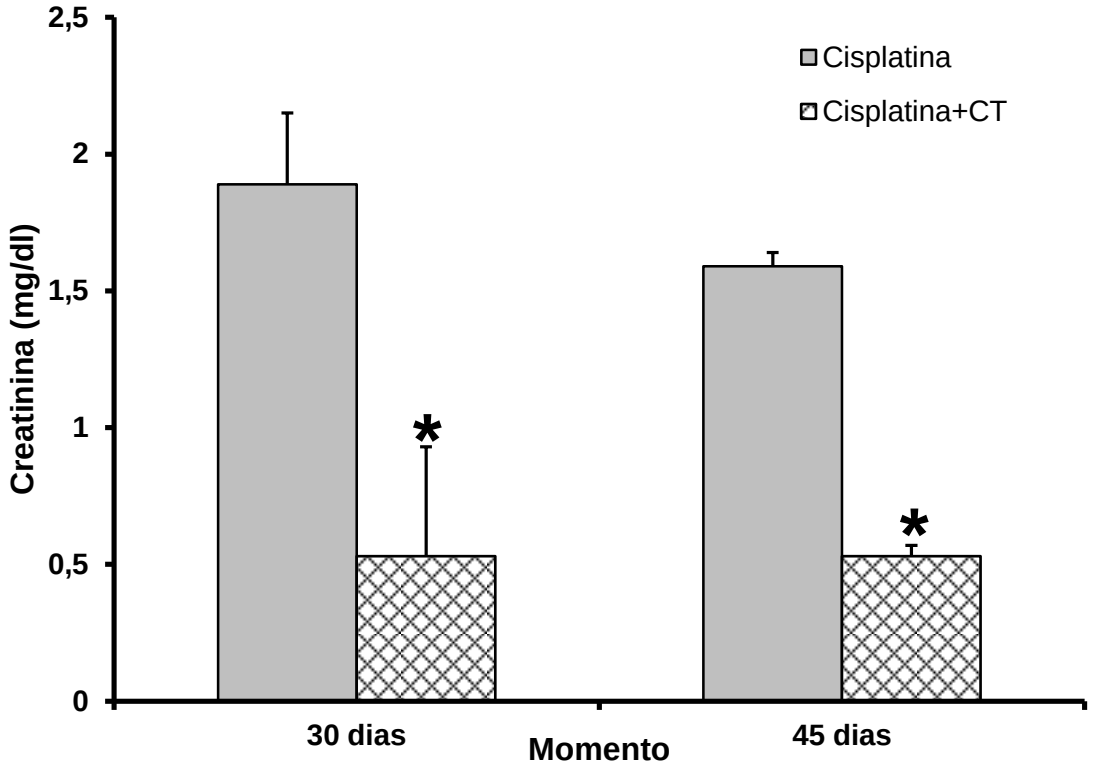


Gráfico 4 - apresentando a taxa de creatinina no sangue dos animais em grupo cisplatina e cisplatina+TM-MO e momentos de 30 e 45dias. Teste Mann-Whitney; (*) Significância < 0,05.

4.5 Histologia renal pós-infusão de cisplatina e CTM-MO

Os resultados referentes ao grau de alteração (0 a 3 +) no exame histológico do tecido renal, nos grupos cisplatina e cisplatina+CTM-MO, nos momentos 48 horas (grupo cisplatina), 30 e 45 dias, estão apresentados na Tabela 3 e Figura 5. Após 48 horas do tratamento com cisplatina, já foi possível observar uma degeneração hidrópica tubular de 3 cruzes (mediana), alteração de 3 cruzes em relação à proteína intratubular, necrose/apoptose tubular de 2 cruzes e necrose global de 1 cruz. Aos 30 dias, nos animais apenas tratados com cisplatino, foi ainda possível verificar degeneração hidrópica tubular (1+), proteína intratubular (1 +) e infiltrado intersticial (1+). Em momento (30 dias), os animais que receberam cisplatina+CTM-MO, apresentavam um grau regeneração significante e com diminuição de proteína intratubular (*p*=0,004), quando comparados com aqueles tratados com cisplatina apenas. Aos 45 dias, foi ainda possível observar nos animais tratados no grupo cisplatina, degeneração hidrópica tubular (1+) e proteína intratubular (1+), com

regeneração significante e diminuição destas alterações nos animais tratados no grupo cisplatina+CTM-MO (degeneração hidrópica tubular, *p*<0,001; proteína intrabular, *p*=0,004).

Tabela 3 - Resultados em mediana referentes ao grau de alteração (0 a 3 +) em análise histológica em rim, grupos cisplatina e cisplatino+CTM-MO em momentos 48 horas, 30 e 45 dias em ratos.

HISTOLOGIA	**Grupo Cisplatina**			**Grupo Cisplatina+CTM-MO**			***p* valor**		
	48hs	**30d**	**45d**	**48hs**	**30d**	**45d**	**48hs**	**30d**	**45d**
	n	n	n	n	n	n			
Tubulite	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	-	1 (0-1)	0 (0-1)	-	0,710	0,383
Deg. hidrópica tubular	3 (3-3)	1 (1-2)	1 (1-1)	-	1 (0-1)	0 (0-0)	-	0,073	**<0,001***
Proteína intratubular	3 (3-3)	1 (1-1)	1 (0-1)	-	0 (0-1)	0 (0-0)	-	**0,004***	**0,004***
Glomerulite	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-	0 (0-0)	0 (0-0)	-	1,000	1,000
Arterite	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-	0 (0-0)	0 (0-0)	-	1,000	1,000
Infiltrado intersticial	0 (0-0)	1 (0-1)	0 (0-1)	-	1 (0-1)	0 (0-2)	-	1,000	0,902
Fibrose intersticial	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	-	0 (0-0)	0 (0-1)	-	0,209	0,710
Esclerose glomerular	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-	0 (0-0)	0 (0-0)	-	1,000	1,000
Calcificações	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-	0 (0-0)	0 (0-0)	-	1,000	1,000
Atrofia cortical	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	-	0 (0-1)	0 (0-1)	-	1,000	0,710
Necrose/Apoptose tubular	2 (1-3)	0 (0-0)	0 (0-0)	-	0 (0-0)	0 (0-0)	-	1,000	1,000
Necrose global	1 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	-	0 (0-0)	0 (0-0)	-	1,000	1,000

Teste de Mann-Whitney. (*) Significância p < 0,005.

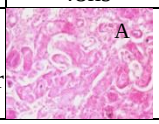
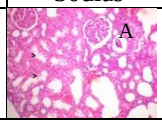
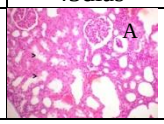
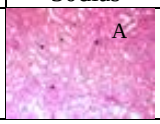
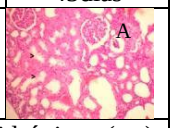
Histologia	Grupo Cisplatina			Grupo Cisplatina+CTM-MO	
	48hs	30dias	45dias	30dias	45dias
Degeneração hidrópica tubular					
Microscopia.óptica x400. Coloração H&E. Legenda: (>) degeneração hidrópica; (>>) proteína intratubular; (*) tubulite.					

Figura 6-A - Fotomicrografia apresentando as lesões significantes em rim em Grupo Cisplatina e Grupo Cisplatina+CTM-MO em momentos 48 horas, 30 e 45 dias, em ratos.

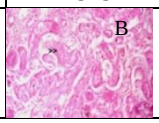
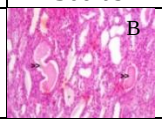
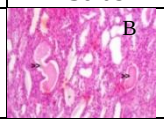
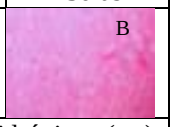
Histologia	Grupo Cisplatina			Grupo Cisplatina+CTM-MO	
	48hs	30dias	45dias	30dias	45dias
Proteína intratubular					
Microscopia.óptica x400. Coloração H&E. Legenda: (>) degeneração hidrópica; (>>) proteína intratubular; (*) tubulite.					

Figura 6-B - Fotomicrografia apresentando as lesões significantes em rim em Grupo Cisplatina e Grupo Cisplatina+CTM-MO em momentos 48 horas, 30 e 45 dias, em ratos.

5 DISCUSSÃO

A IRA quando grave pode levar à necessidade de substituição da função renal por diálise, consequentemente aumentando a frequência de morbidade e mortalidade (FRY; FARRINGTON, 2006; HOSTE; SCHURGERS, 2008). Por isso é crescente o interesse pelo estudo da fisiopatologia da IRA e pela busca de estratégias terapêuticas que modifiquem os resultados desfavoráveis dessa doença tais como a necessidade de diálise, a evolução para uma insuficiência renal crônica, a necessidade de transplante e até mesmo o óbito (METNITZ et al., 2002; YOKOO et al., 2005; MARKS et al., 2015).

Modelos pré-clínicos são, atualmente, utilizados para demonstrar os efeitos das CTM em nefropatias. Dentre as diversas doenças renais que acometem o ser humano, as insuficiências renais são alvo principal da bioengenharia moderna, pelo fato de que a técnica de terapia celular tem condição de proporcionar ao paciente renal a substituição de células específicas com funções perdidas (BRODIE; HUMES, 2005). Esses estudos buscam respostas de como a terapia celular pode auxiliar na regeneração dos túbulos contorcidos renais após lesão isquêmica ou tóxica (LIN et al., 2003; LIN, 2006) bem como causam a normalização de parâmetros bioquímicos. No entanto, os mecanismos envolvidos nesses processos ainda são pouco conhecidos e necessitam que estudos que auxiliem na consolidação desse conhecimento.

As CTM utilizadas nesse estudo foram caracterizadas por diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica. Resultados como esses já estão descritos por outros estudos da área (BAGNANINCHI et al., 2011; PENDLETON et al., 2013; HERMETO et al., 2015) e demonstraram eficiência nos métodos de seleção e expansão clonal utilizados nesse experimento.

A confirmação da migração das CTM para o rim e a sua permanência ainda são discutidas. No entanto, na presente pesquisa as CTM antes de serem transplantadas por via endovenosa foram marcadas por DAPI e 48h após a terapia celular foram observadas no rim. Esse resultado é corroborado por outros estudos que também demonstraram a presença de CTM nos rins (ROSS et al. 2012; TANG et al., 2012). Além da marcação nuclear por DAPI, outros protocolos de localização das CTM nos rins utilizaram detecção pelo uso da proteína verde fluorescente (QIU

et al., 2014), pela detecção de β-galactosidase (β-Gal) (KLINKHAMMER et al., 2014) ou pelo transplante de células provenientes de animais de sexo distintos (animal doador - macho; animal receptor - fêmea) (GRIMM et al., 2001). Apesar dos estudos apresentados anteriormente há autores que indicam ausência de CTM nos rins em experimentos realizados com CTM e IRA (DUFFIELD et al., 2005).

Mesmo diante dessa indefinição, estudos como transplante de CTM têm demonstrado bons resultados (ALTUN et al., 2012; LIU et al., 2012; ERPICUM et al., 2013; XINARIS et al., 2013;) e, em geral, são utilizadas fontes exógenas doadoras das CTM (MORIGI et al., 2004) como também ocorreu nesse trabalho.

Nosso estudo demonstrou que a IRA foi eficientemente causada pela administração da cisplatina, um medicamento muito utilizado no tratamento do câncer, mas que tem como principal complicação a nefrotoxicidade (NISHIHARA et al., 2013; HAGAR et al., 2014). Os níveis de uréia e creatinina foram os biomarcadores utilizados para inferir a IRA e esses se mostraram aumentados após 48h da administração do quimioterápico. Essa doença foi também confirmada, histologicamente, pela observação de degeneração hidrópica tubular, acúmulo de proteína intratubular, necrose e apoptose tubular, e necrose global; em associação com as alterações bioquímicas das provas renais (uréia e creatinina). Confirma ainda a instalação da IRA o fato das alterações bioquímicas e histológicas se manterem mesmo após 30 dias da administração da cisplatina. Já 45 dias após só foi observado o aumento da uréia e os danos histológicos visto que os valores de creatina estavam novamente dentro dos valores de referência (semelhança estatística com o grupo controle). Esses fatos permitem inferir que a dose única de 5mg/kg (p.c.; i.p.) de cisplatina, em ratos Wistar, é uma adequada forma de induzir IRA em modelos experimentais por danos tóxicos. Destaca-se ainda que esse modelo pode ser utilizado para estudos de eventos que associam pacientes em quimioterapia e IRA.

Em relação ao transplante das CTM pode-se observar que o mesmo foi eficiente em causar melhoras no estado global de saúde dos animais submetidos à terapia celular visto que foi eficiente em causar a redução dos níveis sanguíneos de uréia e creatinina, igualando-os aos níveis do grupo controle, 30 dias após a administração do quimioterápico. Histologicamente, nesse mesmo período, observou-se também redução estatisticamente significativa do acúmulo de proteínas intratubulares.

Quarenta e cinco dias após a administração da cisplatina, as CTM ainda foram capazes de reduzir a quantidade de uréia do plasma, a níveis também observados no grupo controle. Já em relação aos achados histológicos observou-se redução estatisticamente significativa da degeneração hidrópica tubular e do acúmulo de proteínas intratubulares.

Os relatos anteriores são corroborados por estudos que também observaram redução nos níveis de uréia e creatinina em animais com IRA submetidos à terapia celular (SHIH et al., 2013; GENG et al., 2014; JIANG et al., 2015). Nos estudos de Imberti et al. (2007) e de Qiu et al. (2014) também foram observados melhorias em parâmetros histológicos em animais com IRA e que receberam o transplante de CTM.

Frente ao exposto é evidente que a terapia celular com CTM demonstra potencial terapêutico na IRA. Os rins, diferentemente de outros órgãos como é o caso do coração e do cérebro, possui grande capacidade de se regenerar após um insulto isquêmico ou tóxico e acredita-se que o reparo tecidual envolva três fases: (I) inflamação - quando diversas células do sistema imune se fazem presente; (II) regeneração quando as células lesionadas são substituídas pelo mesmo tipo celular; e (III) reparação quando o tecido intersticial é cicatrizado (BONVENTRE, 2003; LIN et al., 2008). A regeneração do túbulo, especificamente, para a retomada da função renal ocorre pelo prolongamento, mitose e diferenciação das células não descamadas em função da lesão tecidual de forma que essas cubram a membrana basal, nesse momento, sem revestimento (THADHANI et al., 1996; SHERIDAN; BONVENTRE, 2000; DEVARAJAN, 2006; HUMPHREYS et al., 2008).

Em relação à capacidade das CTM auxiliar na reparação do tecido renal supõe-se que a mesma possa agir (I) modulando a resposta inflamatória visto que essas podem induzir a ocorrência de fagocitose no baço ou no fígado para retirada das CTM da circulação onde estão presentes por pouco tempo (DUFFIELD; BONVENTRE, 2005; DUFFIELD et al., 2005); (II) secretando fatores de crescimento; (III) fundindo-se com células lesionadas; ou (IV) se diferenciando em novas células residentes renais (DUFFIELD; BONVENTRE, 2005; TOGEL et al. 2005; HUMPHREYS; BONVENTRE, 2008).

Os resultados experimentais reforçam que o efeito da terapia celular não se baseia em repopulação e/ou fusão das CTM ao túbulo renal (DUFFIELD; BONVENTRE, 2005; TOGEL et al. 2005; HUMPHREYS; BONVENTRE, 2008). No

entanto, o nosso estudo foi capaz de localizar as CTM no rim 48h após a terapia celular. Mas, segundo Morigi et al. (2006), Humphreys; Bonventre (2007) e Humphreys; Bonventre (2008) esse tempo é insuficiente para que haja repopulação, fusão e/ou transdiferenciação das CTM para a reconstituição do epitélio renal. Logo o fator parácrino é uma alternativa para explicar os resultados encontrados visto que a terapia com CTM relaciona-se com aumento dos níveis de VEGF, HGF e IGF-1 (LANGE et al., 2005; TOGEL et al., 2005) e redução do processo inflamatório, devido ao aumento de citocinas anti-inflamatórias (KRAMPERA et al.; 2005). Outra possível ação seria a capacidade das CTM ativarem as células tronco renais que seriam capazes de sofrer mitose, fazer o processo de diferenciação, migração e assim promover a regeneração do tecido renal e esse parece ser um dos modos de ação mais aceito (OLIVER et al., 2004; LIN et al., 2005).

Sabendo que as terapias utilizadas até o momento para a IRA são paliativas e diante da capacidade da terapia celular com CTM promover melhorias e reestabelecimento das funções renais, o presente trabalho sugere que essa terapêutica inovadora/alternativa possa ser considerada em estudos clínicos para validação e possível desenvolvimento em humanos.

6 CONCLUSÃO

Administração de CTM-MO (células-tronco mesenquimal de medula óssea) para regeneração renal apresenta melhora significante da função renal e de lesões histológicas em insuficiência renal aguda induzida pela cisplatina em ratos.

REFERÊNCIAS*

Aggarwal S, Moggio A, Bussolati B. Concise review: stem/progenitor cells for renal tissue repair: current knowledge and perspectives. Stem Cells Transl Med. 2013 Dec;2(12):1011-9. doi: 10.5966/sctm.2013-0097. Epub 2013 Oct 28. Review. PubMed PMID: 24167320; PubMed Central PMCID: PMC3841081.

Altun M, Zhao B, Velasco K, Liu H, et al.. Ubiquitin-specific protease 19 (USP19) regulates hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) during hypoxia. J Biol Chem 2012; 13;287(3):1962-9. doi: 10.1074/jbc.M111.305615. Epub 2011 Nov 29.

Bagnaninchi PO, Drummond N. Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing. PNAS 2011;108(16):6462–7.

Bittencourt RAC et al.. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. ActaOrtop Bras 2006; 14(1).

Bonventre JV. Molecular response to cytotoxic injury: role of inflammation, MAD kinases and endoplasmic reticulum stress response. Semin Nephologia 2003.

Brodie JC, Humes HD. Stem cell approaches for the treatment of renal failure.Pharmacol Rev. 2005 Sep;57(3):299-313.

Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, et al.. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. Anticancer Agents Med Chem 2007;7:3-18.DOI:http://dx.doi.org/10.2174/187152007779314044.

_____

*De acordo com International Comitte of Medfical Journal Editors, 1979 (Estilo Vancouver). Abreviaturas de periódicos de acordo com Base de Dados MEDLINE.

Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. ExpToxicol Pathol. 2009 May;61(3):223-42. doi: 10.1016/j.etp.2008.09.003. Epub 2008 Nov 4. Review. PubMed PMID: 18986801.

Devarajan P..Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. J Am Soc Nephrol. 2006 Jun;17(6):1503-20. Epub 2006 May 17. ID: 16707563 [PubMed - indexed for MEDLIN].

Duffield JS, Bonventre JV. Kidney tubular epithelium is restored without replacement with bone marrow-derived cells during repair after ischemic injury. Kidney Int. 2005 Nov;68(5):1956-61.

Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, et al.. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. J Clin Invest. 2005. Jul;115(7): 1743-55. Epub 2005 Jun 2. PubMed PMID: 16007251; PubMed Central PMCID: PMC1159124.

Erpicum S, Laugier F, Pfister M, et al.. (2013). Labyrinth.

Fry AC, Farrington K. Management of acute renal failure. Postgrad Med J 2006;82: 106-116 doi:10.1136/pgmj.2005.038588.

Geng X, Feng J, Liu S, Wang Y, et al.. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2014 Mar;169:38-50. doi: 10.1016/j.cbpb.2013.12.007. Epub 2013.

Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM.Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? Mol Pharmacol. 2001 Apr;59(4):657-63. Review. PubMed PMID: 11259608.

Hagar H, Medany AE, Salam R, Medany GE, Nayal OA. Betaine supplementation mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative/nitrosative stress and suppression of inflammation and apoptosis in rats. ExpToxicol Pathol.2014 Dec 5.pii: S0940-2993(14)00151-1. PubMed PMID: 25488130.

Hermeto LC, Oliveira RJ, Matuo R, et al.. Evaluation of pH effects on genomic integrity in adipose-derived mesenchymal stem cells using the comet assay. Genetics and Molecular Research 2015;14 (1):339-348.

Hoste EAJ, Schurgers M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? Crit Care Med. 2008;36(4 Suppl):S146-51.

Humphreys BD, Bonventre JV. The contribution of adult stem cells to renal repair. Humphreys. Nephrol Ther. 2007 Mar;3(1):3-10. Epub 2007 Feb 22.

Humphreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. Annu Rev Med. 2008;59:311-25.

Humphrey N, Mundlos S, Turkmen S. Genes and quadrupedal locomotion in humans. Proc Natl Acad Sci. USA. 2008;105:E26. [PMC free article] [PubMed].

Jia X, Xie X, Feng G, Lű H, Zhao Q, Che Y, Zheng Y, Han Z, Xu Y, Li Z, Kong D. Bone marrow-derived cells can acquire renal stem cells properties and ameliorate ischemia-reperfusion induced acute renal injury. BMC Nephrol. 2012 Sep 10;13:105. doi: 10.1186/1471-2369-13-105. PubMed PMID: 22963129; PubMed Central PMCID: PMC3505151.

Kim JH, Park DJ, Yun JC, Jung MH, Yeo HD, Kim HJ, Kim DW, Yang JI, Lee GW, Jeong SH, Roh GS, Chang SH. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells protect kidneys from cisplatin nephrotoxicity in rats. Am J Physiol Renal Physiol. 2012 May 1; 302(9):F1141-50. doi: 10.1152/ajprenal.00060.2011. Epub2011 Dec 28. PubMed PMID: 22205231.

Klinkhammer BM. et al.. Mesenchymal stem cells from rats with chronic kidney disease exhibit premature senescence and loss of regenerative potential. PLoS one 2014; Published 2014; March 25. DOI: 10.1371/journal.pone.009211.

Krampera M, et al… Mesenchymal stem cells for bone,m cartilage, tendon and skeletal muscle repair. Bone 2006;39(4):678-83.

Lange C, Togel F, Ittrich H, et al.. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. Kidney Int 2005; 68:1613–7.

Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. Am J Physiol. 1996 Apr;270(4 Pt 2):F700-8. PubMed PMID: 8967349.

Lin SB, Li CH, Lee SS, Kan LS. Triterpene-enriched extracts from Ganoderma lucidum inhibit growth of hepatoma cells via suppressing proteinkinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. Life Sci 2003;72:2381–90. [PubMed].

Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. Histol Histopathol. 2013 Sep;28(9):1109-Epub 2013 Apr 16. Review. PubMed PMID: 23588700; PubMed Central PMCID: PMC3839663.

Lin M, Jones-Rhoades, MW, Lau NC, et al.. Regulatory mutations upstream of mir-48, a C. elegans let-7 family micro RNA cause developmental timing defects. Dev Cell 2005: 415-22.

Liu H, Baliga R. Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. Kidney Int. 2003 May;63(5):1687-96. PubMed PMID: 12675844.

Marks H, Kerstens HD, Barakat TS. Dynamics of gene silencing during X inactivation using allele-specific RNA-seq. *Genome Biology* 2015, 16:149 doi:10.1186/s13059-015-0698-x. The electronic version of this article is the complete one and can be found online at:http://genomebiology.com/2015/16/1/149

Meireles LS, Nardi NB.Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. British JournalofHematology. USA, v. 123, p. 702- 711, 2003.

Metnitz PG, Krenn CG, Steltzer H, Lang T, Ploder J, Lenz K, Le Gall JR, Druml W. Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients.CritCare Med. 2002 Sep;30(9):2051-8.

Monteiro B.S. Tratamento de defeitos críticos em calvária de camundongos com células-tronco mesenquimais associadas ou não ao plasma rico em plaquetas. 2009. 109f. Tese (Doutorado Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, MG.

Morigi M, Imberti B, Zoja C, et al.. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. J Am Soc Nephrol 2004;15: 1794-804.

Morigi M, Benigni A, Remuzzi G, Imberti B. The regenerative potential of stem cells in acute renal failure.Cell Transplant. 2006;15[Suppl 1]:111-7. Review. PubMed PMID: 16826803.

Morigi M, De Coppi P. Cell therapy for kidney injury: different options and mechanisms--mesenchymal and amniotic fluid stem cells. Nephron ExpNephrol. 2014; 126(2):59. doi: 10.1159/000360667. Epub 2014 May 19. PubMed PMID: 24854642.

Nishihara K, Masuda S, Shinke H, Ozawa A, Ichimura T, Yonezawa A, Nakagawa S, Inui K, Bonventre JV, Matsubara K. Urinary chemokine (C-C motif) ligand 2 (monocyte chemotactic protein-1) as a tubular injury marker for early detection of cisplatin-induced nephrotoxicity. BiochemPharmacol. 2013 Feb 15;85(4):570-82. doi: 10.1016/j.bcp.2012.12.019. Epub 2013 Jan 2. PubMed PMID: 23291264.

Oliver JA, Maaranf O, Cheema FH, et al.. The rence papilla is a niche for adult kid ney stem cells. Clin Invet 2004;114:795-804.

Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. Biomed Res Int. 2014;2014:967826. doi: 10.1155/2014/967826. Epub 2014 Aug 6. PubMed PMID: 25165721; PubMed Central PMCID: PMC4140112.

Pendleton SJ, Bowman S, Carter C, et al.. The production and evolution of atomic oxygen in the afterglow of streamer discharge in atmospheric pressure fuel/air mixtures. Published 2 July 2013 • 2013 IOP Publishing Ltd • Journal of Physics D: Applied Physics, Volume 46, Number 30

Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. J Pathol. 2001 Sep;195(2):229-35. PubMed PMID: 11592103.

Qiu Y, Pu T, Li L, Cheng F, Lu C, Sun L, et al.. The expression of aldehyde dehydrogenase family in breast cancer. J Breast Cancer 2014;17(1):54-60. doi: 10.4048/jbc.2014.17.1.54. Epub 2014 Mar 28.

Ross, Will J. Percival, Ariel G. Sanchez, et al. The clustering of galaxies in the SDSS-III Baryon Oscillation Spectroscopic Survey: Analysis of potential systematic s*ubmitted on 29 Mar 2012 (v1), last revised 3 May 2012 (this version, v3))*

Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2000 Jul;9(4):427-34.

Shih G, Dube K, Dehlendorf C. We never thought of a vasectomy: a qualitative study of men and women's counselling around sterilization. Contraception 2013; 88(3) 376-81.

Shott S. Statistics for health professionals. London: W.B. Saunders Company, 1990.

Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. N Engl J Med. 1996 May 30;334(22):1448-60.

Tang YY, Lu Q, Fan M, Yang Y, Posner M. Mechanisms of white matter changes induced by meditation. Proc Natl Acad Sci 2012;109(1–5).

Tögel F, Hu Z, Weiss K, et al.. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. Am J Physiol Renal Physiol 2005. doi:10.1152/ajprenal.00007.2005. [PubMed].

Xinaris C, Benedetti V, Rizzo P, et al. In vivo maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions. J Am Soc Nephrol 2012; 23:1857–68.

Yokoo T, Ohashi T, Shen JS, et al.. Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. Proc Natl Acad Sci USA 102: 3296-3300, 2005.

APÊNDICE 1

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 449/2012 do Pesquisador Antônio Urt Filho referente ao projeto de pesquisa **"Uso de célula tronco mesenquimais hepatopoiéticas em modelos de camundongos em insuficiência renal crônicas (IRC)"**, está de acordo com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária de 16 de agosto 2012.

Campo Grande (MS), 16 de agosto de 2012.

Drª Joice Stein
Coordenadora da CEUA

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais

CI 053/2013 – CEUA

De: Dra. Maria Araújo Teixeira
Coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS

Para: Prof. Dra. Andreia Conceição. M.B. Antoniolli Silva

Data: 30.07.2013

Prezada Senhora:

Informamos para os devidos fins que a solicitação de alteração da espécie animal (CI 02/2013- de 26.06.2013) do Protocolo nº 449/2012 e Processo nº23104.004061/20 do pesquisador Antônio Urt Filho, sob sua orientação, referente ao projeto de pesquisa "Uso de Células Tronco Mesenquimais em Modelo de Insuficiência Renal Crônica, em Camundongos", foi encaminhado à CEUA/UFMS e, após análise sob os preceitos éticos e legais vigentes, autoriza a mudança da espécie animal (*Mus muscullus* - camundongo), passando a pesquisa a ser desenvolvida em ratos (*Rattus norvegicus* – Linhagem WISTAR, n=40).

Sendo o que se apresenta para o momento, apresentamos a Vossa Senhoria nossas atenciosas saudações.

Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFMS

Comissão de Ética no Uso de Animais
Cidade Universitária – Caixa Postal 549
Fone: (67) 3345-7187; ceua@propp.ufms.br
70070-900 – Campo Grande - MS