

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**SUPEREXPRESSÃO INDUZIDA DE VEGF E HGF EM
CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS DO
LÍQUIDO AMNIÓTICO NA INIBIÇÃO DA FIBROSE
INTERSTICIAL APÓS ISQUEMIA RENAL AGUDA EM
RATOS**

TESE DE DOUTORADO

Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**SUPEREXPRESSÃO INDUXIDA DE VEGF E HGF EM
CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS DO LÍQUIDO
AMNIÓTICO NA INIBIÇÃO DA FIBROSE INTERSTICIAL
APÓS ISQUEMIA RENAL AGUDA EM RATOS**

Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, área de Concentração em Cirurgia Veterinária, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para
obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Ney Luis Pippi

Santa Maria, RS, Brasil

2012

© 2012

Todos os direitos autorais reservados a Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor. Endereço: Av. Roraima, n. 1000, Universidade Federal de Santa Maria, Hospital Veterinário, Bairro Camobi, Santa Maria - RS, 97110-000. Fone (0xx)55 3220-9400; Endereço Eletrônico: morimv@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**SUPEREXPRESSÃO INDUZIDA DE VEGF E HGF EM CÉLULAS
MESENQUIMAIS ESTROMAIS DERIVADAS LÍQUIDO AMNIÓTICO
NA INIBIÇÃO DA FIBROSE INTERSTICIAL APÓS ISQUEMIA AGUDA
EM RATOS**

elaborada por
Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Ney Luis Pippi, Prof. Dr.
(Presidente/Orientador)

Dominguita Luhrs Graça, Profa. Dr. (UFSM)

Alexandre Krause, Prof. Dr. (UFSM)

Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães, Profa. Dr. (UNESP-Botucatu)

Luciana Maria Fontanari Krause, Profa. Dr. (UNIFRA)

Santa Maria, 17 de Agosto de 2012.

Aos meus pais, Paulo Afonso e Maria Luiza. Todo o esforço para a realização desse trabalho

foi com o intuito de que vocês se orgulhassem de mim.

E ao meu filhote Fluke, nefropata há 5 anos. Amo muito vocês.

Ao meu orientador Ney Luis Pippi, por suas ideias sempre visionárias e pela sua dedicação à
cirurgia experimental.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Paulo Afonso e Maria Luiza, por todos os ensinamentos e apoio em todas as decisões importantes da minha vida. Vocês são um exemplo para mim. Aos meus irmãos, João Paulo e Ana Catarina pelo carinho, ensinamentos e momentos de diversão. Vocês serão sempre os meus melhores amigos!

Ao meu orientador Dr. Ney Luis Pippi, pela oportunidade que recebi para este desafio, pelas críticas construtivas e pela confiança. Você me deu a oportunidade para que eu me desenvolvesse por caminhos próprios, me motivando e guiando quando necessário. Muito obrigada!

To my supervisors at Universiteit Katholiek Leuven, Jaan Toelen and Jan Deprest, for your guidance and encouragement to keep pursuing the results. Thanks for the opportunity and for sharing your knowledge.

Silvia Zia thanks for the great companion and friendship during all phases of this study. Thanks to you we could finish this thesis on time. Everything would be harder and less fun without you

Ao meu amigo e colega, Diego Vilibaldo Beckmann, pelo profissionalismo, empenho e motivação para a realização desse trabalho. Tenho grande admiração pela pessoa e pelo profissional que ele é. Obrigada por todas as idéias, para que tudo fosse o mais eficiente possível.

Marianne Carlon thanks for all teaching about molecular medicine and microsurgery, for supporting during the surgeries and for all your efforts to make the time I spent in Leuven more pleasant, almost like at home, even I was 10.000 km from there.

Ao Professor. Alexandre Mazzanti, pela contribuição em minha formação e por todas as ideias e sugestões cirúrgicas. Obrigada pelos ensinamentos e estímulo à pesquisa.

À professora Dominguita Graça, pela ajuda na análise histológica, pela companhia agradabilíssima e por todos os seus ensinamentos. A docência está no seu sangue e o prazer que você tem em compartilhar o seu conhecimento e ensinar, impressionam a todos. Com certeza me espelharei em você sempre.

À amiga Rosmarini Santos pela ajuda na revisão dessa tese e por estar sempre lá quando eu precisasse. Essa amizade vem de longa data, ainda quando éramos estagiárias.

Aos professores Cristiane Danesi e Marcos D'Ornellas, pela ajuda na análise morfométrica.

Aos professores Ricardo Brainer e Júlio Zenkner pela ajuda nas decisões estatísticas. Vocês são brilhantes!

Ao amigo Didier Quevedo pela ajuda na decisão das colorações e também pelo carinho de sempre. Mesmo após anos distantes, sabemos que podemos contar um com o outro.

Ao CNPq e ao Erasmus Mundus pelo fornecimento das bolsas de doutorado no Brasil e na Bélgica.

À Universidade Federal de Santa Maria, minha escola, a qual tenho muito orgulho e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade oferecida.

Ao Laboratório de Cirurgia Experimental – LACE e ao Laboratório de Ginecologia Experimental da Katholiek Universiteit Leuven pelas instalações e equipamentos que possibilitaram a realização deste experimento.

Aos colegas da pós-graduação Maurício da Rosa, Tiago Eilers, Bianca Bertolletti, Fabíola Dalmolin, Saulo Pinto Filho, Gabrielle Freitas, Rogério Guedes, Graciane Aiello, Laécia Trindade e Arícia Sprada pelos momentos agradáveis e pelo compartilhamento de conhecimento. Foi muito bom poder crescer e aprender com vocês.

Aos estagiários Marcella Teixeira e Diego Tolotti, pela ajuda sempre que precisei.

Às amigas, quase irmãs, Natália Pesset e Cristiani Bolzan por estarem sempre lá nos momentos mais difíceis e também nos mais importantes!! Muito bom saber que posso sempre contar com vocês.

Anke Van der Perren and Kim Nijs thanks for all support and friendship. You girls became much more than friends during these two years. Our talks renew my energy to keep going and to not give up of getting the results for this thesis. Thanks a lot for the true friendship. And Anke, thanks for helping with the perfect surgical pictures!

Aos amigos Liliam Beckmann, Claudia Verffel, Cristiano Figueiredo dos Santos, Raquel Mori, Kauê Danilo Reis, Franciele Walker, Carlos Eduardo Romanini, Juliana Cassoli, Camila Takeno e Suzana Garcia por tantos momentos agradáveis. Vocês certamente foram importantes para que eu não desistisse!

Lauran Reyniers, Dragana Vidovic, Amelie Fassbender and Diego Garcia thanks for sharing your knowledge always I needed and for all pleasant moments we spent together.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário, em especial à Nelci, à Liandra e, à Isabel, que sempre foram amigas cordiais e solícitas.

Agradeço a todos os professores do curso pelos conhecimentos compartilhados.

“Around here, however, we don't look backwards for very long. We keep moving forward, opening up new doors and doing new things, because we're curious... and curiosity keeps leading us down new paths”.

(Walt Disney)

RESUMO

Tese de doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

SUPEREXPRESSÃO INDUZIDA DE VEGF E HGF EM CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS DERIVADAS LÍQUIDO AMNIÓTICO NA INIBIÇÃO DA FIBROSE INTERSTICIAL APÓS ISQUEMIA AGUDA EM RATOS

AUTOR: MARINA GABRIELA MONTEIRO CARVALHO MORI DA CUNHA
ORIENTADOR: NEY LUIS PIPPI

Data e local da defesa: Santa Maria, 17 de Agosto de 2012.

O tratamento eficaz para a lesão renal aguda tem melhorado nos últimos anos, sendo objeto de inúmeras pesquisas, no entanto a taxa de mortalidade desta patologia ainda permanece elevada. Além disso, pacientes que sobrevivem após evento isquêmico possuem altos riscos de doença renal crônica progressiva. As células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano (hAFSC) são uma nova fonte alternativa de células-tronco que expressam marcadores progenitores renais (CD24). A possibilidade da associação das terapias gênica e celular permite a manipulação dessas para superexpressar o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), dois dos fatores de crescimento mais importantes para a regeneração renal. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar se as hAFSCs transduzidas com VEGF e HGF possuem maior ação nefroprotetora, por meio de efeito mitótico e anti-inflamatório a curto prazo, levando a uma inibição da fibrose a longo prazo em modelos de isquemia e reperfusão renal. Na primeira fase do experimento, isolou-se, caracterizou-se as propriedades imunofenotípicas e a capacidade de diferenciação das hAFSCs e após selecionou-se uma linhagem clonal que expressasse os marcadores CD24 e CD117. Após essa linhagem foi transduzida com vetores lentivirais (VL) codificando VEGF e HGF. Na segunda fase, induziu-se lesão de isquemia e reperfusão (I/R) renal pelo clampeamento do pedículo renal por 50 minutos, em 50 ratos Wistar, machos. O grupos de tratamento foram divididos como (n=10 por grupo): grupo controle, tratado somente com o meio Chang; grupo tratado com hAFSC não transduzidas (1×10^6 /rato); grupo tratado com hAFSC transduzidas com LV-VEGF (1×10^6 /rato); grupo tratado com hAFSC transduzidas com LV-HGF (1×10^6 /rato) e o grupo tratado tanto com hAFSC transduzidas com LV-VEGF ($0,5 \times 10^6$ /rato) quanto LV-HGF ($0,5 \times 10^6$ /rato). A creatinina sérica foi mensurada em 24 horas, 48 horas e 2 meses após a lesão I/R e as análises histológicas foram realizadas para avaliar os seguintes parâmetros: necrose tubular e formação de cilindros hialinos pelas colorações de PAS e H&E em 48 horas e fibrose intersticial pelas colorações Tricrômico de Masson e Picrosirius Red em 2 meses. Adicionalmente, a expressão de KI-67, α -SMA e TGF- β foram analisadas por imunistoquímica em 48 horas. Os resultados permitiram observar um efeito benéfico da terapia com hAFSCs em lesões de I/R pela melhora mais rápida da função renal e menor índice fibrótico a longo prazo, no entanto obteve-se um efeito ainda melhor quando associaram-se as hAFSCs transduzidas com VEGF e HGF comparado com as hAFSC não transduzidas. Já em 24 h observou-se o efeito renoprotetor nos grupos hAFSC e hAFSC VEGF + HGF pelo valor significativamente menor da creatinina comparado com o controle. Em 48h todos os grupos ainda apresentavam valores significativamente elevados de creatinina comparado com os ratos sham, exceto o grupo hAFSC HGF + VEGF. Observou-se também que os grupos hAFSC VEGF +HGF e hAFSC VEGF tiveram um aumento significativo na proliferação tubular renal, provavelmente pelo efeito da superexpressão de VEGF. Além disso, observou-se redução da expressão de α -SMA e TGF- β em 48h nos grupos hAFSCs não-transduzidas, hAFSC VEGF+HGF e hAFSC HGF. Como o TGF- β 1 está envolvido na transdiferenciação de células epiteliais tubulares em miofibroblastos α -SMA-positivos, o qual aumenta a deposição de matriz extracelular, a redução na expressão de α -SMA e TGF- β são indicadores de inibição da fibrose. Apesar de serem descritos diversos benefícios nefroprotetores do VEGF e do HGF observou-se nesse estudo uma lesão renal mais pronunciada do que o controle nos grupos hAFSC VEGF e hAFSC HGF, tanto em relação à função renal quanto à necrose tubular, o que sugere um efeito tóxico causado pela alta concentração de secreção desses fatores de crescimento. A terapia celular utilizando a combinação de hAFSCs transduzida com vetores lentivirais codificando VEGF e HGF resultou em efeito nefroprotetor ainda maior do que sua forma não transduzida após evento isquêmico renal, o qual foi caracterizado pelo aumento do índice mitogênico, melhor função renal e inibição de genes fibrogênicos, levando a um menor índice fibrótico em dois meses.

Palavras-chave: Regeneração renal. Terapia gênica. TGF- β .

ABSTRACT

Doctorate Thesis
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

AMNIOTIC FLUID-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS OVEREXPRESSING VEGF OR HGF INHIBIT INTERSTITIAL FIBROSIS AFTER ISCHEMIC ACUTE RENAL INJURY IN RATS

AUTHOR: MARINA GABRIELA MONTEIRO CARVALHO MORI DA CUNHA
ADVISOR: NEY LUIS PIPPI

Date and place of defense: Santa Maria, August 17th, 2012.

Despite extensive research on an effective treatment for acute renal injury (AKI), the mortality rate still remains high. Moreover, patients who survive AKI are at high risk for chronic progressive kidney disease. Mesenchymal stromal cells derived from human amniotic fluid (hAFSCs) are a new source of stem cells which express renal progenitor markers (CD24). The possibility of combining gene and cell therapy allows stem cells to be manipulated to overexpress vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF), two of the most important growth factors for kidney regeneration. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether hAFSCs overexpressing VEGF and HGF demonstrate a nephroprotective effect due to their mitogenic and anti-inflammatory effect, leading to a long term inhibition of fibrosis. In the first phase of this study, we isolated hAFSCs from human amniotic fluid samples, characterized their immunophenotypic properties and differentiation capacity and selected a clonal lineage which expresses CD24 and CD117 markers. This lineage was subsequently transduced with lentiviral vectors (LV) encoding VEGF and HGF. In a second phase, renal ischemia and reperfusion (I/R) injury was induced in a rat model by clamping the renal pedicle for 50 minutes in 50 male Wistar rats. Treatment groups (n = 10 per group) were assigned as follows: a control group treated with Chang Medium only; a group which received non-transduced AFSC (1×10^6 cells/animal); a group which received AFSC transduced with LV-VEGF (1×10^6 cells/animal); a group which received AFSC transduced with LV-HGF (1×10^6 cells/animal); and a group treated with AFSC transduced both with LV-VEGF ($0,5 \times 10^6$ cells/animal) and AFSC transduced with LV-HGF ($0,5 \times 10^6$ cells/animal). Serum creatinine was measured at 24 hours, 48 hours and 2 months after I/R injury and histological analysis was performed to analyze following parameters: tubular necrosis and hyaline cast formation by PAS and H&E staining at 48 hours, and interstitial fibrosis by Masson's Trichrome and Picrosirius Red staining at 2 months. Additionally, the expression of KI-67, α -SMA and TGF- β 1 was assessed by immunohistochemistry. The results showed a beneficial effect of AFSCs delivered to rats with I/R injury, which was characterized by a faster improvement in renal function and a lower fibrotic index. However, administration of hAFSCs overexpressing VEGF and HGF resulted in an even better outcome compared to non-transduced AFSCs. As early as 24 hours after AFSC delivery, a nephroprotective effect was observed after both hAFSC and hAFSC VEGF + HGF treatment, which was characterized by significantly lower creatinine values compared to those of the control group. At 48 hours, all treatment groups still demonstrated a significant increase in creatinine values compared to sham animals, except in the hAFSC HGF + VEGF group. In hAFSC HGF + VEGF and hAFSC VEGF treatment groups, a significant increase in renal tubules proliferation was observed, measured by an increase in KI-67 expression, which is probably due to the effect of VEGF overexpression. Furthermore, we observed a decrease in α -SMA and TGF- β expression at 48 hours in the non-transduced hAFSC, hAFSC HGF and hAFSC VEGF + HGF groups. As TGF- β 1 is involved in transdifferentiation of tubular epithelial cells to α -SMA-positive myofibroblasts which increases extracellular matrix deposition, the reduction in the expression of α -SMA and TGF- β indicates an inhibition of fibrosis. Although VEGF and HGF have both been described to have nephroprotective properties, we interestingly observed that the hAFSC expressing both VEGF and HGF resulted in more pronounced kidney damage compared to non-treated animals when treated with 1×10^6 cells/animal, which suggests that toxic side effects are possibly induced by high secretion levels of growth factors. In conclusion, cellular therapy using the combination of hAFSCs transduced with lentiviral vectors encoding VEGF and HGF, resulted in a stronger nephroprotective effect than non-transduced hAFSC delivered to rats with I/R injury, which was characterized by an increased mitosis index, an improved renal function and an inhibition of genes involved in fibrosis resulting in a lower fibrotic index at two months.

Key words: Renal regeneration. Gene therapy. TGF- β .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Figura representativa do isolamento mecânico das colônias de células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano.....	35
Figura 2-	Construções dos plasmídeos usados expressando eGFP, VEGF e HGF, tendo como gene de seleção a forma truncada CD34 e tendo como promotor o SFFV. Sendo LTR, <i>long terminal repeat</i> ; RRE, <i>rev response element</i> e IRES, <i>internal ribosome entry site</i>	40
Figura 3-	As células estromais mesenquimais do líquido amniótico derivadas da Imunoseleção para c-Kit: CD117 positivas (A) e (B) e CD 117 negativas (C) e (D).....	44
Figura 4-	Aparência das colônias formadas após plaqueamento do líquido amniótico e em fase de realização da seleção mecânica: colônia em fase inicial (A) e colônias em fase de transferência para a placa de 96 poços (B, C, D).....	45
Figura 5-	Exemplo de diferentes populações de hAFSC selecionadas mecanicamente em passagem 4 de cultura. (100 e 200X).....	46
Figura 6-	Curva de sobrevivência dos clones das hAFSCs. A idade gestacional foi descrita em semanas.....	46
Figura 7-	Imunofenotipagem analisados por citometria de fluxo nos 79 clones de células estromais mesenquimais do líquido amniótico isolados mecanicamente de amostras de amniocentese.....	48
Figura 8-	Análise de citometria de fluxo para avaliar o volume celular e a complexidade interna das células das amostras isoladas por imunoseleção (A) e mecanicamente (B).....	49
Figura 9-	Coloração de Oil redO para detectar diferenciação adipogênica nas células estromais mesenquimais do líquido amniótico derivadas de diferentes semanas de gestação.....	50
Figura 10-	Coloração de Vermelho de Alizarina para detectar diferenciação osteogênica nas células estromais mesenquimais do líquido amniótico derivadas de diferentes semanas de gestação.....	50
Figura 11-	Coloração de Azul Alciano para detectar diferenciação condrogênica nas células estromais mesenquimais do líquido amniótico derivadas de diferentes semanas de gestação.....	50

Figura 12-	Extração de corante Alizarina red nas amostras de células estromais mesenquimais do líquido amniótico de diferentes semanas de gestação, induzidas à diferenciação osteogênica.....	51
Figura 13-	Extração de corante Azul de Alcian nas amostras de células estromais mesenquimais do líquido amniótico de diferentes semanas de gestação, induzidas à diferenciação condrogênica.....	51
Figura 14-	Expressão de Oct-4 nas células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano de diferentes semanas de gestação. Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e células troinco embrionárias humanas (hESC) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.....	52
Figura 15-	Força relativa dos promotores CMV, SFFV, CypA e CBA estão representadas pela intensidade média de fluorescência de vetores expressando eGFP.....	53
Figura 16-	Coloração de X-Gal para detectar a atividade de β -Galactosidase em células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com vetor lentiviral expressando o gene reporter Lac-Z.....	54
Figura 17-	Expressão de GFP em células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com vetor lentiviral expressando o gene reporter eGFP.....	55
Figura 18-	Confirmação da superexpressão dos genes VEGF (A) e HGF (B) pela análise de PCR em tempo real das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas.....	56
Figura 19-	Expressão protéica de VEGF nas células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano não transduzidas e transduzidas com VEGF....	56
Figura 20-	Imunofluorescência para detectar a expressão de VEGF nas células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano não transduzidas (hAFSC) (A) e transduzidas com VEGF-tCD34 (B) e de HGF nas hAFSC não transduzidas (C) e transduzidas com HGF-tCD34 O núcleo foi contracorado com Hoechst.....	57
Figura 21-	Citometria de fluxo para CD117, CD24, CD90, CD73, HLA-ABC, CD44, CD29, CD105, HLA-DR, CD 34 e CD 45 das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com HGF.....	58
Figura 22-	Citometria de fluxo para CD117, CD24, CD90, CD73, HLA-ABC, CD44, CD29, CD105, HLA-DR, CD 34 e CD 45 das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com VEGF.....	59

Figura 23-	Análise de citometria de fluxo para avaliar o volume celular e a complexidade interna das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano (A) e após transdução com VEGF (B) e HGF (C).....	60
Figura 24-	Diferenciação das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com VEGF e HGF em linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas.....	60
Figura 25-	Extração de corante vermelho de alizarina nas amostras das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com VEGF e HGF, induzidas à diferenciação osteogênica.....	61
Figura 26-	Extração de corante azul alciano nas amostras das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com VEGF e HGF e nas células tronco embrionárias, induzidas à diferenciação condrogênica..	61
Figura 27-	Aspecto do rim após colocação do clampe vascular atraumático buldogue no pedículo renal. Obervar a coloração vermelho-acastanhada antes da colocação do clampe (A) e a evidência de isquemia o seu escurecimento após a colocação do clampe (B).....	73
Figura 28-	Passos para o acesso à arterial renal. Dissecção da aorta abdominal caudalmente à artéria renal, indicada pela seta branca (A), colocação de reparo ao redor da aorta abdominal (B), posicionamento do clampe vascular buldogue cerca de 1 cm caudal aos pedículos renais, logo acima das artérias genitais (C) e colocação do clampe no pedículo renal direito, etapa necessária apenas no grupo B.....	75
Figura 29-	Esquema da cirurgia de acesso à artéria renal realizado no grupo B. Colocação dos clampes na artéria aorta abdominal, caudalmente às artérias renais e no pedículo renal esquerdo (A); localização da inserção do cateter 26G. ligeiramente cranial ao clampe buldogue para administração de metade da tinta naquim (B) e transferência do clampe do pedículo esquerdo para o direito com o intuito de permitir a administração da outra metade da tinta nanquim.....	75
Figura 30-	Ângulo de inserção do cateter na aorta abdominal para acesso da artéria renal.....	76
Figura 31-	Aspecto dos rins direito (preto) e esquerdo vermelho-acastanhado), imediatamente após a administração de nanquim em um tempo	81
Figura 32-	Rim direito (A) e esquerdo (B) corados por Hematoxilina & Eosina no grupo em que se administrou nanquim (A) em apenas um tempo e sem a colocação de clampe na artéria renal (Magnificação100x).....	82
Figura 33-	Amostras de criosecção coradas com solução X-gal. Baço (A) e pulmão (B) de rato, 24h após a administração de hAFSC marcada com Lac-z (magnificação 200x).....	82

Figura 34-	Curva de sobrevivência dos animais dos diferentes grupos de ratos com lesão de isquemia e reperfusão tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano transduzida ou não com VEGF e HGF.....	83
Figura 35-	Gráficos com valores de VEGF sérico de ratos com lesão de isquemia e reperfusão após 24 h do tratamento com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano transduzidos ou não com VEGF e HGF.....	84
Figura 36-	Fotos representativas da histologia renal 48 horas após indução de isquemia e reperfusão por 50 minutos em ratos. Cortes histológicos corados por H & E, objetiva de 10X: sham (ratos operados, sem indução de lesão e sem tratamento; controle, ratos com I/R tratados com meio de cultivo; hAFSC, ratos com I/R tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC); hAFSC VEGF + HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e HGF; hAFSC VEGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e hAFSC HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com HGF (n=5 por grupo).....	86
Figura 37-	Fotos representativas da histologia renal 48 horas após indução de isquemia e reperfusão por 50 minutos em ratos. Cortes histológicos corados por ácido periódico de Schiff (PAS), objetiva de 10X: sham (ratos operados, sem indução de lesão e sem tratamento; controle, ratos com I/R tratados com meio de cultivo; hAFSC, ratos com I/R tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC); hAFSC VEGF + HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e HGF; hAFSC VEGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e hAFSC HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com HGF(n=5 por grupo).....	87
Figura 38-	Fotos representativas de cortes histológicos de rins de ratos após indução de lesão de isquemia e reperfusão por 50 minutos corados pela técnica de imuno-histoquímica para α -SMA sendo observada a positividade em marrom e utilizando-se objetiva de 20X: sham (ratos operados, sem indução de lesão e sem tratamento; controle, ratos com I/R tratados com meio de cultivo; hAFSC, ratos com I/R tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC); hAFSC VEGF + HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e HGF; hAFSC VEGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e hAFSC HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com HGF (n=5 por grupo).....	89

Figura 39-	Fotos representativas de cortes histológicos de rins de ratos após indução de lesão de isquemia e reperfusão (I/R) por 50 minutos corados pela técnica de imuno-histoquímica para TGF- β , sendo observada a positividade em marrom eutilizando objetiva de 20X: sham (ratos operados, sem indução de lesão); controle, ratos tratados com meio de cultivo; hAFSC, ratos tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC); hAFSC VEGF + HGF, ratos tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e HGF; hAFSC VEGF, ratos tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e hAFSC HGF, ratos tratados com hAFSC transduzidas com HGF (n=5 por grupo)..	90
Figura 40-	Imuno-histoquímica para KI-67 de tecido renal, região cortical, de um rato após 48 h de indução da lesão de isquemia e reperfusão, tratado com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (20X).....	91
Figura 41-	Análise do índice mitogênico avaliado por morfometria das lâminas coradas por imuno-histoquímica para KI-67. Gráfico indica núcleos positivos por campo de grande aumento nos diferentes grupos analisados. *** indica diferença significativa $p < 0,0001$	91
Figura 42-	Fotos representativas da histologia renal 2 meses após indução de isquemia e reperfusão por 50 minutos em ratos. Cortes histológicos corados por Tricrômico de Masson, evidenciando o colágeno tipo I em azul utilizando objetiva de 20X: sham (ratos operados, sem indução de lesão); controle, ratos tratados com meio de cultivo; hAFSC, ratos tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC); hAFSC VEGF + HGF, ratos tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e HGF; hAFSC VEGF, ratos tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e hAFSC HGF, ratos tratados com hAFSC transduzidas com HGF (n=5 por grupo).....	93
Figura 43-	Fotos representativas da histologia renal 2 meses após indução de isquemia e reperfusão por 50 minutos em ratos. Cortes histológicos corados por Picosirius red. Foto capturada com luz polarizada e objetiva de 10X: sham (ratos operados, sem indução de lesão); controle, ratos tratados com meio de cultivo; hAFSC, ratos tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC); hAFSC VEGF + HGF, ratos tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e HGF; hAFSC VEGF, ratos tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e hAFSC HGF, ratos tratados com hAFSC transduzidas com HGF (n=5 por grupo).....	94
Figura 44-	Análise da fibrose renal avaliada por morfometria das lâminas coradas pelo tricrômico de Masson. Gráfico indica porcentagem da área positiva por campo de grande aumento nos diferentes grupos analisados.* indica diferença comparado ao grupo hAFSC VEGF. *** indica diferença significativa $p < 0,0001$ quando comparado com todos os outros grupos. ANOVA , pos teste Tukey.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Anticorpos monoclonais usados nas células cultivadas para realização de imunofenotipagem.....	36
Tabela 2-	<i>Primers</i> usados para o sequenciamento de HGF e VEGF.....	40
Tabela 3	Imunofenotipagem das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas em diferentes tempos em cultura.....	55
Tabela 4	Estudos já realizados relacionados a lesão renal e tratados com terapia celular.....	68
Tabela 5-	Valores séricos de creatinina em ratos com lesão de isquemia e reperfusão, nos tempos 24 h, 48 h e dois meses, tratados com células estromais mesenquimais do líquido amniótico transduzidos ou não com VEGF e HGF.....	83
Tabela 6-	Peso dos rins de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão e tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC) transduzidas ou não com VEGF e HGF. Valores expressos em gramas (g), com respectivas médias e desvio padrão. Kruskal wallis seguido de pós teste de Dunn.....	84
Tabela 7-	Média e desvio padrão dos escores de lesão tubular aguda em cortes histológicos de ratos corados por Hematoxilina & Eosina nos diferentes grupos após 48 horas de lesão renal isquêmica tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC) transduzidas ou não com VEGF e HGF. * AFSC difere do controle (p< 0,05).....	85
Tabela 8-	Média e desvio padrão dos escores de lesão tubular aguda em cortes histológicos de ratos corados por H&E nos diferentes grupos após 48 horas de lesão renal isquêmica tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC) transduzidas ou não com VEGF e HGF. *difere do sham(p< 0,05). Kruskal Wallis pós teste Dunns.....	92

LISTA DE REDUÇÕES

- α -SMA**- *alfa smooth muscle actin* ou actina de músculo liso alfa
- AFSC**- *Amniotic Fluid derived mesenchymal stromal cells* ou Células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico
- CT** – Células-tronco
- CTA**- Células-tronco do adulto
- DRA**- Doença renal crônica
- ELISA**- *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- eGFP**- *enhanced green fluorescent protein* ou proteína verde fluorescente
- ESC**- *Embryonic Stem Cell* ou Células tronco embrionárias
- HGF**- *Hepatocyte growth factor* ou fator de crescimento de hepatócitos.
- IA**- Intrarterial
- IP**- intraperitoneal
- IRES**- *Internal ribosome entry site*
- IV**- intravenoso
- IPSC**- *induced pluripotent stem cell* ou Células tronco pluripotentes induzidas
- LRA**- Lesão renal aguda
- LTR**- *Long terminal repeat*
- MSC**- *Mesenchymal stromal cells* ou células mesenquimais estromais
- RRE**- *Rev. Response element*
- TGF- β** - *Transforming growth factor- beta* ou fator de crescimento transformador-beta
- VEGF**- *Vascular endothelial growth factor* ou fator de crescimento endotelial vascular
- VL**- Vetores lentivirais

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	Sequenciamento do plasmídeo codificando VEGF	125
ANEXO 2	Sequenciamento do plasmídeo codificando HGF	126
ANEXO 3	Escores de lesão avaliados em cortes histológicos renais corados por H&E após 48 horas de isquemia e reperfusão renal.....	127
ANEXO 4	Imagem da análise morfométrica para quantificação de células positivas para KI-67. Observar que as células já contadas ficam marcadas para que não seja duplamente quantificada.....	128
ANEXO 5	Escores de lesão avaliados em cortes histológicos renais corados por H&E após dois meses de lesão por isquemia e reperfusão renal.....	129
ANEXO 6	Imagem da análise morfométrica para Tricrômico de Massom. Mensuração da área de fibrose.....	130

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
EPÍGRAFE.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE REDUÇÕES.....	XVII
LISTA DE ANEXOS.....	XVIII
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. CAPÍTULO 1.....	25
Revisão Bibliográfica.....	25
Material e Métodos.....	34
1. Isolamento das células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico	34
2. Caracterização das células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico....	36
3. Manipulação das células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico	39
4. Caracterização e avaliação da eficiência da transdução das células manipuladas.....	40
5. Estatística.....	43
Resultados.....	44
3. CAPÍTULO 2.....	62
Revisão Bibliográfica.....	62
Material e Métodos.....	73
1. Modelo de isquemia e reperfusão renal.....	73
2. Técnica cirúrgica de acesso renal.....	74
3. Transplante de hAFSC transduzida com Lac-z.....	76
4. Indução da lesão e transplante celular.....	76
5. Análises do efeito da terapia celular.....	77
6. Estatística.....	80

Resultados.....	81
4. DISCUSSÃO.....	96
5.CONCLUSÃO.....	107
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
7. ANEXOS.....	125

1. INTRODUÇÃO

A lesão renal aguda (LRA) é a diminuição súbita da função renal caracterizada pela incapacidade de regular os fluidos, eletrólitos e equilíbrio ácido-base. A IRA é causada devido a um insulto isquêmico ou tóxico ao rim e é potencialmente reversível, no entanto, frequentemente leva à falência múltipla dos órgãos (MORIGI et al., 2004; TÖGEL et al., 2005). A taxa de mortalidade em humanos é de 50% (BRADY et al., 1991; LANE, et al., 1994), apesar da realização de hemodiálise e em cães e gatos essa taxa é de 60% (VADE et al., 1997) e de 47% (WORWAG & LANGSTON, 2008), respectivamente.

A incidência de insuficiência renal aguda e crônica está aumentando em todo o mundo (PORT et al., 2000, XUE ET AL., 2006, HSU ET AL., 2007). Dessa forma, necessita-se de uma nova estratégia terapêutica para um tratamento mais efetivo para evitar a fibrose e o desenvolvimento de doença renal crônica.

A medicina regenerativa é um campo interdisciplinar amplo que tem como principal objetivo a reconstrução, o reparo ou a reposição de tecido ausente ou lesionado com o intuito de restaurar a função e arquitetura do órgão ou tecido alvo. O cirurgião possui um papel fundamental na medicina regenerativa, já que a patologia cirúrgica está frequentemente presente com uma necessidade urgente de regeneração de órgãos e tecidos.

A terapia celular é uma estratégia terapêutica médica que introduz novas células em tecidos lesionados com o intuito de tratar uma doença ou lesão. Atualmente numerosos centros de pesquisa investigam o potencial da terapia com células-tronco para mudar e melhorar o tratamento clínico atual de diversas doenças em humanos e animais. A habilidade das células-tronco de se autorrenovarem e possuírem graus variados de capacidade de diferenciação levam a inúmeras possibilidades de exploração com o intuito terapêutico. Elas podem ser usadas tanto para a geração de tecidos com a finalidade de repor tecidos doentes ou lesionados como para modular a progressão de doenças, tais como as autoimunes ou inflamatórias (NAUTA et al., 2007).

Avanços na terapia com células-tronco (CT) estão progredindo rapidamente e vêm provendo a associação da terapia gênica, com alta tecnologia para a introdução de genes recombinantes em diferentes tecidos. A terapia gênica oferece uma estratégia atraente para entrega direta de genes de fatores de crescimento para as células com a intenção de alterar a síntese de proteínas no aparelho celular, modificando a resposta de cura (TAUB et al., 1998). Pelo fato de as células-tronco do adulto (CTA) ter um potencial de regeneração limitada a sua

utilização para a terapia gênica e celular torna-se restrita.

As células-tronco embrionárias (ESC) são a população de células-tronco mais plásticas e possuem capacidade de autorrenovação indefinida e seriam interessantes para a manipulação genética, no entanto três fatores importantes limitam sua aplicação clínica (JUNG, 2009): em primeiro lugar, o debate ético visto que em alguns países não é permitido gerar ou até mesmo trabalhar com linhagens de ESC humanas. Em segundo lugar, ESCs pluripotentes podem induzir a formação de teratoma após o transplante. Em terceiro lugar, ESCs podem provocar reações imunológicas após o transplante (BIEBACK & BRINKMAN, 2010). Da mesma forma, as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) ainda apresentam limitações em relação à sua aplicabilidade clínica por causa de seu potencial teratogênico (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006).

O tecido mais frequentemente analisado é o da medula óssea. No entanto, a aspiração do sangue de medula óssea é um procedimento altamente invasivo e obtêm-se apenas um número baixo de células por punção, cerca de 1-10 células mesenquimais estromais (MSC) a cada 10.000 células mononucleares (GRONTHOS et al., 2003). Além disso, tem sido observado que a capacidade de diferenciação e a longevidade das MSCs declinam com a idade (STENDERUP et al., 2003; BIEBACK et al., 2008). Portanto, tem sido considerada necessária a pesquisa de fontes alternativas de MSCs, especialmente em alguns casos refratários e complicados.

O líquido amniótico tem sido usado por décadas como uma fonte consistente de diagnóstico pré-natal, no entanto, estudos recentes têm fornecido dicas importantes sobre o potencial das células mesenquimais estromais do líquido amniótico (AFSC) para se tornar uma importante fonte alternativa de células-tronco (MITKA, 2001; KAVIANI et al., 2001; PRUSA et al., 2003; PRUSA et al., 2004). A combinação de ter uma idade cronológica jovem que minimiza a viabilidade de mutações incorporadas (BIEBACK & BRINKMAN, 2010) e ser extraembrionário, proporcionando um acesso relativamente fácil para colheita de células faz do fluido amniótico uma importante fonte alternativa de células-tronco fetais (PRUSA et al., 2003; FAUZA, 2004; DE COPPI et al., 2007). Uma vez que a maioria do líquido amniótico é derivada da urina fetal, é razoável assumir que as células progenitoras renais são um constituinte desse líquido (DA SACCO, 2010). As AFSCs isoladas são boas candidatas para aplicações de terapia celular, superando assim os problemas éticos relacionados com outras fontes de células-tronco fetais. Vários estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram a eficácia das células mesenquimais estromais modificadas geneticamente para expressar e

secretar fatores terapêuticos, confirmando a sua capacidade de servir como uma excelente base para terapia gênica mediada por células (Yu et al., 2008; CHEN et al., 2011; YUAN, et al., 2011).

Em ESCs derivadas de corpos embrióides, podem-se detectar células epiteliais tubulares e podócitos por meio de marcadores específicos (KRAMER et al., 2006). As ESC são incorporadas em células epiteliais tubulares com quase 100% de eficiência, quando injetadas em um metanéfron em desenvolvimento (KIM & DRESSLER, 2005). Portanto, as ESC seriam uma das melhores fontes de células para a reparação renal e representariam uma ferramenta poderosa para tais abordagens. Por outro lado, o seu uso para terapias renais é restringida devido ao risco de desenvolvimento de tumores malignos (THOMSON et al., 1998) e pela rejeição imunológica após o transplante.

Vários tipos de células progenitoras têm sido isoladas a partir de rins de adultos. Essas células apresentam a expressão de marcadores tais como CD133, CD24, Sca-1 ou Lin e são localizadas nos túbulos renais, no interstício da papila renal ou no pólo urinário da cápsula de Bowman (PERIN et al., 2007). Algumas linhagens clonais de AFSCs são CD 24 positivos, dessa forma o líquido amniótico parece uma nova fonte promissora de células-tronco para o tratamento de lesões renais.

É importante notar que, após o transplante, apenas uma pequena quantidade de células-tronco integram no parênquima renal. Isso levou à suposição de que os efeitos protetores das células-tronco na reparação renal são mediadas pela estimulação parácrina / endócrina (TOGEL et al., 2005; BI et al., 2007; PERIN et al., 2007). BI et al. (2007), IMBERTI et al. (2007) e TOGEL et al. (2007) sugeriram que a função protetora renal ocorre devido à secreção dos fatores de crescimento de insulina-I (IGF-I), factor de crescimento de hepatócitos (HGF), factor de crescimento vascular endotelial (VEGF), e fator de crescimento epidérmico (EGF). Além disso, acreditando-se em uma ação parácrina, a liberação de microvesículas e de transferência de informação genética pode ser responsável pelo efeito benéfico das MSCs na recuperação da lesão renal aguda experimental (BRUNO et al., 2009). Dessa forma, a manipulação genética das células tronco para superexpressar esses fatores de crescimento seria interessante para que houvesse um efeito ainda melhor do que as células tronco não modificada.

O objetivo desse estudo foi avaliar se o transplante celular com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico transduzidas com VEGF e HGF possuem maior efeito renoprotetor a curto prazo, por meio de efeito mitótico e antiapoptótico e efeito

antifibrótico a longo prazo.

Essa tese foi dividida em dois capítulos de acordo com as duas principais fases experimentais para realizá-la. No primeiro capítulo está descrita a forma como foram isoladas, caracterizadas e manipuladas geneticamente as células-tronco derivadas do líquido amniótico. No capítulo dois discorre-se sobre as técnicas cirúrgicas utilizadas para esse estudo: o modelo de isquemia e a técnica de acesso à artéria renal e sobre o transplante das células-tronco derivadas do líquido amniótico transduzidas ou não com VEGF e\ou HGF em modelos de isquemia e reperfusão renal em ratos.

2. CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Células-tronco

As células-tronco (CTs) têm o potencial de se desenvolverem em diferentes tipos celulares do corpo durante o início da vida e o crescimento (WEISSMAN et al., 2001). Além disso, elas servem como reparo do sistema interno de muitos tecidos, entrando em mitose quando estimuladas para repor o tipo celular necessário durante toda a vida do indivíduo.

As CTs podem ser distinguidas de outros tipos celulares por duas características importantes. Primeiro, elas são células indiferenciadas capazes de se autorrenovarem por meio de divisão celular. Segundo, sob certas condições fisiológicas ou experimentais, elas podem ser induzidas a se tornar células órgão- ou tecido-específicas com funções especiais. Em alguns órgãos que apresentam uma elevada renovação celular, incluindo o sistema hematopoiético, intestino e pele, as células-tronco se dividem quase que constantemente para suprir progenitores para novas células somáticas. Outros órgãos tais como os rins e os pulmões, possuem uma taxa de renovação celular bem menor, mas essas células são capazes de proliferar e reparar sob estímulos, quando em lesão (BONVENTRE, 2003).

Até recentemente, pesquisadores primariamente trabalhavam com dois tipos de CT: células-tronco embrionárias (ESC) e CT do adulto (CTA). O trabalho pioneiro em CT foi realizado em camundongo. O estudo de sua biologia na espécie murina conduziu a um método para derivar as células-tronco a partir de embriões humanos, referido como células -tronco embrionárias (hESC). Como os embriões usados nesses estudos foram embriões redundantes oriundos de procedimentos de fertilização *in vitro*, a criação e utilização de hESC provocou um grande debate ético. O segundo tipo de CT utilizado na pesquisa é a CTA. Acredita-se que este tipo celular é indiferenciado e pode ser encontrado entre as células diferenciadas em um tecido ou órgão.

Tipicamente, há um número muito pequeno de células-tronco em cada tecido e uma vez removidas do corpo, sua capacidade de dividir é limitada, tornando a geração de grandes quantidades de CT difícil. À procura de uma alternativa, pesquisas recentes elucidaram as condições que permitem algumas células adultas especializadas a serem reprogramadas geneticamente para assumir uma células com características tronco. Esse novo tipo de CT é chamado de célula-tronco pluripotente induzida (iPSC).

Fontes de células-tronco

A plasticidade ou o potencial de diferenciação das células-tronco pode ser classificados como totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes.

A totipotência é a habilidade de uma única célula se dividir e produzir todos os tipos de células diferenciadas do organismo, incluindo tecidos extra-embrionários. O desenvolvimento dos mamíferos começam quando um espermatozóide fertiliza um óvulo e cria uma única célula totipotente (zigoto). Nas primeiras horas após a fertilização, esta célula se divide em células totipotentes idênticas, que mais tarde podem desenvolver-se em qualquer uma das três camadas germinativas de um ser humano (endoderme, mesoderme ou ectoderme) e em células da camada citotrofoblásticas ou da camada sinciciotrofoblástica da placenta. Depois de atingir o estágio de 16-células, as células totipotentes da mórula diferenciam em células que irão eventualmente tornar-se blastocisto de massa celular interna ou o trofoblasto exterior. Aproximadamente quatro dias após a fertilização e após vários ciclos de divisão celular, estas células totipotentes começam a se especializar.

As CT pluripotentes podem ser derivadas da massa interna celular antes da implantação do embrião ou isoladas de um conjunto de células fetais primordiais, acima da alantóide (THOMSON et al., 1998; ANDREWS et al., 2005). Apesar de um trabalho recente ter mostrado que as ESC podem derivar de um único blastômero isolado usando procedimento similar ao usado rotineiramente para o diagnóstico genético de pre-implantação (KLIMANSKAYA et al., 2007), a destruição de um blastocisto ou um embrião necessário para o seu isolamento ainda levanta questões éticas (LO & PARHAM 2009). As células-tronco multipotentes podem se diferenciar em diversos tipos celulares, no entanto essa diferenciação é limitada a apenas uma camada germinativa.

As CTAs podem ser encontradas em quase todos os tecidos e têm sido extensivamente caracterizadas pelo seu potencial terapêutico. Elas podem ser multipotentes (por exemplo, as células-tronco hematopoiéticas e as células mesenquimais estromais) ou unipotentes (células progenitoras, por exemplo).

As CT hematopoiéticas são capazes de dar origem a todos os tipos de células sanguíneas: glóbulos vermelhos, linfócitos B e T, células NK, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e mastócitos. As CTAs foram identificadas em vários órgãos e tecidos. Acredita-se que elas residam em uma área específica de cada tecido (chamado de "nicho de células-tronco"). As CTs podem permanecer quiescentes (sem divisão) durante longos períodos até que são ativadas por uma necessidade fisiológica de manutenção tecidual, ou por alguma alteração patológica, devido a alguma doença ou lesão tecidual.

FRIEDENSTEIN et al. (1976) inicialmente isolaram as CTsoriundas da medula óssea pela sua capacidade de adesão ao plástico de placas de Petri e demonstraram que essas células cresciam em colônias com morfologia fibroblástica, denominadas unidades formadoras de colônia de fibroblasto ou células estromais medulares. Atualmente, elas são denominadas como "células-tronco mesenquimais" ou "células mesenquimais estromais" (MSC) com base na sua propriedade de se diferenciar em uma variedade de tecidos mesodérmicos, tais como o osso, a cartilagem e o tecido adiposo. Além da medula óssea, as MSCs foram também encontradas em quase todos os órgãos e tecidos pós-natais, incluindo o tecido adiposo (ZUK et al., 2002), perióstio (DE BARI et al., 2001), membrana sinovial, líquido sinovial (DE BARI et al., 2001a), músculo (ASAKURA et al., 2001), derme, dentes decíduos, pericitos, osso trabecular, gordura infrapatelar, cartilagem articular, e sangue de cordão umbilical (BIANCO et al., 2008; REBELATTO et al., 2008). As MSCs têm demonstrado grande potencial para uso clínico, devido ao seu isolamento conveniente, a sua baixa imunogenicidade, que permite o transplante alogênico sem drogas imunossupressoras; a falta de controvérsia ética, e ao seu potencial de se diferenciar em tipos de células de tecidos específicos (TOMA et al., 2002) com a atividade trófica (NAUTA & FIBBE, 2007; OH et al., 2008; ANKRUM & KARP, 2010). Além disso, há evidências crescentes de que as MSCs possuem potencial imunomodulador e propriedades anti-inflamatórias (DA SILVA MEIRELLES et al., 2008).

Embora diversos marcadores fenotípicos têm sido mostrados para ser expressos em MSCs, ainda não existem marcadores específicos únicos que possam ser utilizados para assegurar a sua homogeneidade. Como parte dos critérios mínimos, as MSCs humanas devem ter: (i) capacidade de adesão ao plástico, (ii) a expressão das moléculas de superfície CD73, CD90, e CD105 e ausência de expressão de CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, e HLA-DR, (iii) a capacidade de diferenciação mesodérmica em osteoblastos, condrócitos, e adipócitos, sob condições de diferenciação padrão *in vitro*.

Células-tronco humanas derivadas do líquido amniótico

Em humanos, o líquido amniótico aparece no início da segunda semana de gestação como uma película pequena de líquido entre as células do epiblasto. O fluido expande e separa o epiblasto do amnioblasto, formando assim a cavidade amniótica (MIKI & STROM, 2006).

A origem das células do líquido amniótico ainda é muito discutível. A maioria das células presentes são terminalmente diferenciadas e têm limitada capacidade proliferativa

(GOSDEN & BROCK, 1978; SIEGEL et al., 2007), no entanto alguns estudos demonstraram a presença de um subconjunto de células com um potencial proliferativo e de diferenciação (TORICELLI et al, 1993;. STREUBEL et al, 1996).

Durante a gravidez o líquido amniótico contém principalmente células fetais e possivelmente células da placenta. Acredita-se que o mecanismo responsável pela produção e renovação do líquido amniótico influencie o tipo celular presente na cavidade amniótica. Na primeira metade da gestação, a maior parte do líquido amniótico é o resultado do transporte ativo de sódio e cloreto oriundos da membrana amniótica e pele fetal, devido ao movimento passivo concomitante de água (BRACE, 1999). Na segunda metade da gestação o fluido vem da micção fetal. Uma fonte adicional importante de líquido amniótico é a secreção a partir do trato respiratório (OLVER & STRANG, 1974; MESCHER et al., 1975). A deglutição fetal e excreção do trato gastrointestinal, enquanto que não volumosa, também desempenham um papel na composição do fluido amniótico (MULLER et al., 1994). Como resultado da dinâmica de fluidos, as células presentes nas vias urinárias, respiratórias e gastrointestinal podem ser expelidas para dentro da cavidade amniótica (BURGHARD et al., 1987; MULLER et al., 1994). Todas estas variáveis que desempenham um papel na composição do fluido amniótico parecem contribuir para o perfil variável do componente celular do fluido amniótico.

Diferentes metodologias foram usadas para gerar linhagens de células clonais de hAFSC de população celular heterogênea. O método de imunoseleção para c-kit (receptor para o fator de células-tronco) foi demonstrado por DE COPPI et al., (2007). Essas células representaram cerca de um por cento das células presentes no líquido amniótico do segundo trimestre. Essas células foram denominadas células-tronco do líquido amniótico (AFSC). Eles podem ser cultivadas sem a presença de *feeders*, duplicam em 36 horas e possuem telômeros longos, mantêm seu estado indiferenciado e de pluripotência, possuem clonogenicidade e estabilidade genômica. Sendo esta última confirmada por cariótipo de série por mais de 250 ou 350 duplicações (DE COPPI et al., 2007; DA SACCO et al., 2010) ou mais de 20 passagens em cultura (ROUBELAKIS et al, 2011.). Além disso, foi possível gerar linhagens clonais destas células, verificadas por marcação retroviral, as quais foram capazes de se diferenciar em linhagens representativas de todas as três camadas germinativas (DE COPPI et al., 2007).

Quase todas as linhagens clonais de AFSC expressam Oct-4 e Nanog, marcadores de um estado pluripotente indiferenciado. As AFSC c-kit + Lin- de humano e camundongos apresentaram um potencial de multi-linhagem hematopoética *in vitro* e *in vivo*, apesar de ter

baixa ou ausência de expressão de CD34 (DITADI et al., 2009). As linhagens humanas de AFSC c-kit-positivas podem formar corpos embrióides em 18-82% dos casos. A formação de corpo embrióide foi acompanhada por uma diminuição na expressão de Oct-4 e nodal e a indução de marcadores de diferenciação, tais como Pax 6, nestina (ectodérmica), GATA 4 e HBE1 (mesodérmica) (VALLI et al., 2010).

Outra técnica descrita para o isolamento das AFSCs é o método de isolamento mecânico descrito por, PHERMTHAI & ANAGOOU (2010), o qual não utiliza nenhuma substância xeno-imunológica, permitindo o desenvolvimento de técnicas futuras de um sistema de produção de células livre de substâncias xenógenas. A técnica inicia pela seleção de MSCs aderentes oriundas de uma cultura primária de células do líquido amniótico. Uma célula individual selecionada é chamada de célula de partida ou precursora e é utilizada como iniciante para a geração de uma linhagem celular clonal de AFSC.

Uma variedade de diferentes tipos de MSCs do líquido amniótico foram isolados e caracterizados. Estas linhagens celulares são amplamente multipotentes com características intermediárias entre as ESCs e CTAs. Assim, estas células-tronco exibem típicos marcadores de células mesenquimais estromais, tais como CD 29, CD 90, CD 166, CD 73, CD 105, CD 44 (TSAI et al., 2006; DE COPPI et al., 2007; DA SACCO et al., 2010) e são negativos para os marcadores de superfície hematopoiética CD 45, CD 34 e CD 14 (PRUSA & HENGSTSCHLAGER, 2002; PRUSA et al., 2003; TSAI et al., 2004; ROUBELAKIS et al., 2007) e também têm características de células-tronco multipotenciais, como demonstrado pela expressão de marcadores embrionários, incluindo Oct-4 e SSEA-4 (PRUSA et al., 2003; DE COPPI et al., 2007). A caracterização de marcadores de superfície das AFSC revelou alta expressão de histocompatibilidade principal (MHC) de Classe I e ausência de MHC de Classe II ou moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86, CD40) consistente com relatos anteriores (DE COPPI et al., 2007). Isso indica que as AFSC, assim como as MSCs, provavelmente não ativam respostas de rejeição em hospedeiros alogênicos. Os marcadores de superfície observados para as AFSC não são consistentes entre os relatórios de diferentes grupos. Enquanto alguns laboratórios descobriram que as AFSC são negativas para CD117 (TSAI et al., 2004; CHIAVEGATO et al., 2007), outro grupo foi capaz de isolar as AFSC expressando CD117 por imunoseleção utilizando microesferas magnéticas (DE COPPI et al., 2007). Uma vez que existem diferentes relatos sobre o perfil de expressão das AFSCs, existe a necessidade de uma investigação mais profunda para caracterizar melhor essa nova fonte de células-tronco.

Apesar da sua alta taxa proliferativa, estas células apresentam um cariótipo normal

quando expandidas *in vitro* e não formam tumores *in vivo* (DE COPPI et al., 2007; SESSAREGO et al., 2008), mesmo 7 meses após o transplante (CARRARO et al., 2008).

Diferenciação das AF-MSC

Uma grande subpopulação apresenta comprometimento para diferenciação em linhas germinativas definidas, variando de progenitores inespecíficos a tipos celulares maduros diferenciados. As AFSCs são caracterizadas pelo potencial de diferenciação ao longo de todas as três camadas germinativas incluindo hepatócitos, osteócitos, condrócitos, adipócitos (KOLAMBKAR et al., 2007, DE COPPI et al., 2007; NADRI & SOLEIMANI, 2007), da linhagem neuronal (TSAI et al., 2004) e renal (PERIN et al., 2007).

PERIN et al. (2007) identificaram uma população CD24+OB-cadherin+ expressando marcadores com características específicas renais (PAX-2, LIM-1, nephrin, PDGFRA, TRKA, E-cadherin, CD24 e OB-cadherin), incluindo precursores de podócitos, de células epiteliais tubulares e células mesangiais. A presença de células progenitoras específicas renais, em especial os precursores de podócitos no líquido amniótico humano pode representar uma nova fonte valiosa de células para terapias regenerativas que são potencialmente aplicáveis a uma ampla gama de doenças renais.

Manipulação genética das células-tronco

Duas estratégias principais estão disponíveis para a transferência de genes para os tecidos: transferência genética direta *in vivo*, a qual realiza a transferência de genes de fatores de crescimento diretamente no DNA de células do meio ambiente lesionado por injeção direta de DNA de plasmídeos ou usando técnicas inovadoras, tais como biolística, na qual o vetor plasmidial é aderido a microesferas de ouro e expelido de um sistema de ar comprimido pelo tecido por bombardeamento de micropartículas de gene por pistola de genes (DI PEPPE et al., 2002) ou microsemeadura (AILAWADI et al., 2002); a outra abordagem é a transferência de genes *ex vivo* pelo transplante de culturas de células transgênicas para o órgão-alvo. Após a cultura destas células por várias passagens, elas podem ser 'transduzidas' utilizando-se vetores virais contendo o alvo de DNA de plasmídeo, ou podem ser transfectadas utilizando-se estratégias de vetores não virais tais como as técnicas de lipoplexão, recombinação homóloga ou eletroporação (TAUB et al., 1998; SUPP et al., 2002). A vantagem das estratégias *ex vivo* é o impacto sinérgico do substrato celular cultivado e os fatores de crescimento expressos sobre o microambiente lesionado.

Tem sido sugerido que as MSCs podem ser utilizadas como veículos para terapia gênica devido a sua alta quimiotaxia para as áreas de lesão (CHEN et al., 2001, 2003). Para aplicações clínicas, as células transplantadas podem ser utilizadas tanto para reparar, substituir ou regenerar o tecido danificado / órgãos; expressar enzimas ou genes para repor ou superar a deficiência; ou como sistemas de distribuição de drogas ou genes. No entanto as CTAs têm um potencial de regeneração limitada e, como consequência a sua utilização para a terapia gênica e celular é limitada. A transdução e expressão de dois diferentes genes marcadores ou repórteres, lacZ e eGFP, têm sido demonstrada sem que haja evidência de efeito sobre o fenótipo das hAFSC e seu potencial de diferenciação (GRISAFI et al., 2008). Em particular, num estado indiferenciado, as hAFSC continuaram a expressar ambos os transgenes, bem como os marcadores multipotenciais típicos, tais como Oct4 e SSEA4. Quando cultivados em regimes de diferenciação, as células transduzidas podem ainda diferenciar-se em osteócitos e adipócitos que expressam os genes específicos de cada linhagem.

Vetores virais para transferência genética

Os vírus são veículos eficazes para infectar células, introduzir material genético dentro do genoma do hospedeiro e forçar a célula a replicar o genoma viral a fim de produzir novas partículas virais. Os vírus podem ser desenhados geneticamente em vetores virais que não repliquem mais, mas que mantenham a capacidade de infectar e introduzir genes dentro da célula. Por exclusão de partes do genoma viral e substituindo-os pelos genes de interesse, a aplicação do vetor vai resultar em uma única infecção sem replicação na célula hospedeira. A concepção geral de vetores virais baseia-se na separação física em diferentes plasmídeos dos elementos cis envolvidos na transferência do genoma do vetor a partir de elementos de ação trans que codificam as proteínas virais (estrutural). Estes plasmídeos transportam os componentes necessários para montar uma partícula de vetor durante a produção de vetor em células produtoras. Os vetores virais podem ser utilizados tanto para a superexpressão quanto para o silenciamento de determinados genes. O transgene codificado pelo vetor pode ser uma proteína reporter para visualização das células marcadas por técnicas de imagiologia imunohistoquímicas ou não-invasiva, tais como a bioluminescência, técnicas de medicina nuclear ou ressonância magnética (DEROOSE et al., 2009). Para tratamentos com terapia gênica, a proteína expressa pode ser uma proteína relacionada com a doença tratada, com o objetivo de modular uma afecção patológica (KIRIK et al., 2003) ou uma proteína terapêutica. Vários sistemas de vetores baseados em vários vírus têm sido desenvolvidos. A escolha do sistema de vetor depende do tamanho do gene de interesse, a duração desejada da expressão

do gene, a célula-alvo e problemas de segurança biológica .

Para gerar a AFSC modificada é essencial utilizar uma plataforma de vetores com a capacidade de transduzi-las com alta eficiência. Os adenovírus recombinantes são os vetores mais interessantes: eles são relativamente fáceis de construir, podem ser produzidos em elevada titulação e atingir elevada eficiência de transdução tanto em células proliferativas como não-proliferativas. No entanto, os adenovírus não integram no DNA celular e a aplicação de altos títulos usados muitas vezes provocou reações imunológicas em ensaios clínicos (WONG & CHIU, 2011). A transdução com este vetor viral tem sido utilizada em ESC e CTA de murinos e de humanos (MIZUGUCHI et al., 2005; KAWABATA et al., 2006; ZACHOS et al., 2006; YUE et al., 2008).

Além dos vetores de adenovírus, os vetores lentivirais (VL) representam um sistema altamente eficiente de transdução para as células-tronco. Os lentivírus podem transferir uma quantidade significativa de material genético dentro do DNA da célula hospedeira, por isso, eles são um dos métodos mais eficientes de transferência genéticas por vetor. Os vírus da imunodeficiência felina (FIV), o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da imunodeficiência símia (SIV) são alguns exemplos de lentivírus. A transferência gênica baseada em vetores lentivirais permite o carregamento e integração de um material genético exógeno ao genoma de uma célula alvo, o que permite a expressão estável do transgene tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BOKER et al., 2008; MEYERROSE et al., 2008; WONG & CHIU, 2011).

Vetores lentivirais

Os VLs são derivados de lentivírus, uma família de retrovírus complexos que têm a capacidade de se replicar em células que não se dividem, em oposição a retrovírus simples. Vários estudos têm mostrado que os VLs derivados de HIV-1 são de fato capazes de uma estável e eficiente expressão do transgene *in vivo*, sem indução de resposta imune significativa (NALDINI et al., 1996; BAEKELANDT et al., 2002).

O protótipo do lentivírus é o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), que tem um diâmetro de 110 nm. O genoma tem três grandes regiões codificantes em comum com os retrovírus simples (gag, pol e env), ladeado por duas repetições terminais longas (LTR). Gag codifica a proteína da matriz estrutural do núcleo, do capsídeo e nucleocapsídeo, pol codifica as enzimas virais (protease, transcriptase reversa (RT) e integrase) e env codifica os componentes da glicoproteína do envelope viral. Além disso, retrovírus complexos contém

seis genes acessórios (*tat*, *rev*, *vpr*, *vpu*, *vif* e *nef*) que codificam proteínas reguladoras adicionais. Estes genes acessórios não são essenciais para a replicação viral em cultura de células, mas sim determinar a patogenicidade da infecção viral *in vivo*.

Desenho de vetores virais

A primeira geração de VLS derivados de HIV-1 foi desenvolvida em 1996 por NALDINI et al. (1996) e produzidos por transfecção tripla de células 293T (linhagem de células de rim embrionário humano) com três diferentes plasmídeos, proporcionando os elementos *cis* e *trans* necessários para a produção de partículas de vetor. O primeiro plasmídeo, o de **empacotamento**, codifica proteínas virais estruturais a partir de *gag* e *pol* de enzimas sob o controle de um promotor constitutivo. Por razões de segurança biológica, o sinal de empacotamento (Ψ) e o gene *env* foram excluídos. O **plasmídeo de envelope** codifica a glicoproteína do envelope do vírus da estomatite vesicular (VSV-G). O envelope de VSV-G assegura uma melhor estabilidade da partícula em relação ao vetor de vírus com envelope de HIV. O terceiro plasmídeo, o de **transferência**, codifica o transgene de interesse sob o controle de um promotor heterólogo. Ele contém sequências de ação *cis* necessárias para a encapsidação, transcrição reversa e integração realizado por duas repetições terminais longas (LTR). Os LTRs são necessários para a integração do DNA proviral mediada pela integrase viral, além de possuir um promotor para a sua transcrição. Após a transfecção tripla, as partículas de vetor produzidos pelas células 293T são liberados no meio, purificados e concentrados.

Biosegurança dos vetores lentivirais

Os VLS derivados do HIV-1 podem levar a preocupações em relação à biossegurança devido à patogenicidade bem conhecida desse vírus. Uma questão importante é a ocorrência potencial de retrovírus de replicação competente, que pode, teoricamente, ser gerado durante a produção de vetor por recombinação homóloga. Um grande esforço tem sido empreendido para melhorar a biossegurança de VLS. Além da deleção do gene acessório no plasmídeo de transferência, reduzindo ou eliminando a patogenicidade de HIV-1, VLS mais seguros têm sido desenvolvidos através da divisão da sequência de ação *cis* e *trans* em dois plasmídeos e a deleção do promotor e de elementos potenciadores no vetor de transferência propriamente dito. Isso reduz a probabilidade de recombinação homóloga.

MATERIAL E MÉTODOS

1 isolamento das células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico

1.1 Isolamento inicial das hAFSc por seleção mecânica

Cinco a dez mililitros de 24 amostras independentes de líquido amniótico foram obtidas a partir de mulheres grávidas com 15-22 semanas de gestação, submetidas à amniocentese para detecção de alterações genéticas, tais como a síndrome de Down. O Comitê de Ética da UZ Leuven aprovou este protocolo de estudo.

No prazo máximo de até 2 horas, sendo mantidas à 37° C, as células foram passadas através de um filtro celular de 40µm (BD Falcon), para filtrar células epiteliais escamosas, e subsequentemente as outras células e os detritos celulares foram isoladas do líquido amniótico por meio de centrifugação a 200x g durante 5 min. O sobrenadante foi removido e o sedimento celular foi ressuspenso em meio de crescimento consistindo em α -MEM¹, 15% de soro fetal bovino², 1% de L-glutamina³, 1% de penicilina / estreptomicina⁴ e 18% Chang B e 2% Chang C⁵. As células foram expandidas em uma placa Petri por meio de incubação em câmara com 5% de CO₂, umidificada e à 37° C.

1.2 Seleção por C-Kit

O meio de crescimento foi substituído com novo meio depois de quatro dias, quando as primeiras células aderidas puderam ser identificadas. O meio de cultivo era trocado a cada quatro dias até que as células tornaram-se confluentes. Depois disso, a imunoseleção para c-Kit foi realizada utilizando-se um kit de triagem magnética celular para CD117 de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente as células recém tripsinizadas em suspensão unicelular foram incubadas com um anticorpo monoclonal anti-CD117 rato anti-humano diretamente conjugado com microesferas magnéticas⁶. As células CD117-positivas foram purificadas por incubação num aparelho Mini-MACS⁷ seguido por um passo de lavagem e procedimento de eluição. As células selecionadas foram subcultivadas rotineiramente a uma

¹ GIBCO ® Invitrogen, Gent, Belgium.

² GIBCO ® Invitrogen, Gent, Belgium.

³ GIBCO ® Invitrogen, Gent, Belgium.

⁴ GIBCO ® Invitrogen, Gent, Belgium.

⁵ Irvine Scientific, Wicklow, Ireland

⁶ CD-117 MicroBead Kit humano, MACS, Miltenyi Biotec, Leiden, The Netherlands.

⁷ MACS. Miltenyi Biotec, Leiden, The Netherlands.

diluição de 1:4 a 1:8. Não permitiu-se que as células atingissem confluência superior a 70%, sendo expandidas sempre que necessário para posterior análise.

1.3 Seleção mecânica

Para identificar as “células de partidas”, selecionaram-se sob a luz de um microscópio invertido, as colônias primárias aderidas à placa com aspecto fibroblastóide. As células individuais foram detectadas, identificadas e cultivadas, subsequentemente para formar as colônias de hAFSC. Para evitar a confluência de colônias vizinhas, as células que crescessem muito próximas umas das outras foram mecanicamente removidas, sendo o meio de cultivo removido em seguida. A cultura foi mantida na placa de cultura primária durante 48 horas. Em seguida, cada colônia celular foi separada mecanicamente por meio de aspiração utilizando-se uma ponteira de 20 microlitros, sob visualização em microscópio invertido. As células aspiradas foram ressemeadas em um poço individual de uma placa de 96 poços. A cultura foi mantida em incubadora com 5% de CO₂, sob umidificação e à 37° C. Quando uma cultura de células clonal atingiu a confluência de 70% na área de cultivo, foi realizada repicagem por tripsinização e replaqueamento em uma placa de 24 poços e depois em uma placa de 6 poços e, finalmente, mudou-se para uma placa de Petri de 10 centímetros (Figura 1). As células foram expandidas até a confluência de 70% e, em seguida, rotineiramente subcultivadas com uma diluição de 1:3

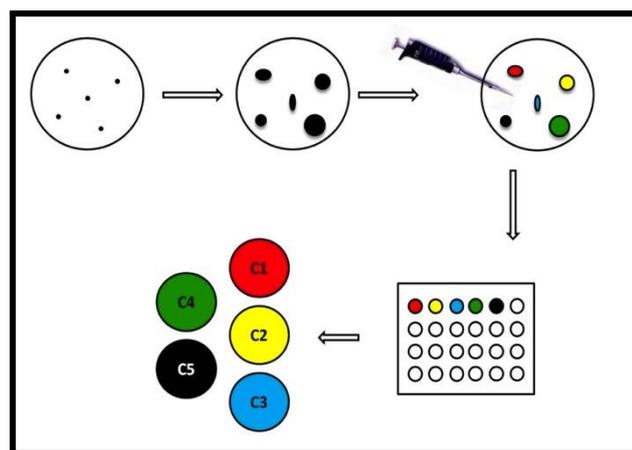


Figura 1. Figura representativa do isolamento mecânico das colônias de células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano.

2 Caracterização das células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico

2.1 Citometria de Fluxo (FACS)

As hAFSC foram caracterizadas por análise de citometria de fluxo na passagem 4. Para isso, 100.000 células foram colhidas e ressuspensas em 1 mL de meio de coloração (PBS + BSA a 1%) em um tubo de FACS e centrifugadas a 300xg durante 5 min. As células foram subsequentemente incubadas com anticorpos conjugados com FITC ou PE- contra os diferentes marcadores CD⁸ (Tabela 1) durante 30 min a 4-6 ° C. Após a lavagem, as células coradas foram analisadas utilizando um citômetro de fluxo⁹, utilizando o software da Quest celular. Em seguida os dados foram calculados utilizando o software FlowJo¹⁰.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais usados nas células cultivadas para realização de imunofenotipagem :

Marcadores positivos	PE camundongo anti humano CD117
	FITC camundongo anti humano CD24
	FITC camundongo anti humano CD90
	PE camundongo anti humano CD44
	PE camundongo anti humano CD105
	PE camundongo anti humano CD73
	FITC camundongo anti humano CD29 (Acris)
	FITC camundongo anti humano HLA-a/b/c
Marcadores Negativos	PE camundongo anti humano HLA-DR
	PE camundongo anti humano CD34
	PE camundongo anti humano CD45

2.2 Ensaio de diferenciação

As células foram analisadas quanto à sua capacidade para se diferenciarem em linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica nas diferentes semanas de gestação nas quais foram isoladas. A diferenciação foi realizada em uma monocamada. As células foram plaqueadas a uma densidade de 15.000 células / poço em uma câmara de LabTec¹¹, e cultivadas a 37 ° C em uma atmosfera úmida (5% CO₂) por diferentes períodos de tempo e meios de diferenciação específicos.

⁸ BD Bioscience, Becton, Dickinson and Company, Belgium.

⁹ BD Bioscience, Becton, Dickinson and Company, Belgium.

¹⁰ Tree Star, Ashland, OR, USA

¹¹ Nunc; Rochester, NY, USA

Diferenciação osteogênica

A diferenciação osteogênica foi induzida em cultura de AFSC passagem 5-8 em confluência de 70%, durante 4 semanas em meio osteogênico (MO). O MO consistiu no meio de diferenciação osteogênica disponível comercialmente¹² e foi usado de acordo com as instruções do fabricante. A diferenciação osteogênica das células foi avaliada por coloração de vermelho de alizarina na deposição extracelular de matriz calcificada (ECM).

Diferenciação adipogênica

Para induzir a diferenciação adipogênica, as AFSC de passagem 5-8 em cultura foram cultivados a 100% de confluência e, subsequentemente, diferenciados com meio de diferenciação adipogênica durante 21 dias em câmara com 5% CO₂ a 37 ° C. O meio foi composto por 10% de FBS, 10⁻⁸ M de dexametasona, 0,2 mM de vitamina C e 10 mM β-glicerofosfato em DMEM com alta glucose¹³. A diferenciação na linhagem adipogênica foi determinada por coloração Oil Red O.

Diferenciação condrogênica

Para induzir a diferenciação condrogênica, as células de passagem 5-8 foram cultivadas em alta densidade em massa *pellet*. Semearam-se 20 µl de suspensão em *pellet* (400.000 células ressuspensas em PBS) em poços individuais de uma placa de 24 poços. As células foram deixadas sem meio durante três horas a 37 ° C em incubadora a 5% CO₂ para que aderissem ao plástico e então cultivadas durante 24 horas em meio de crescimento. No dia seguinte, o meio foi substituído pelo meio de diferenciação condrogênica, o qual consistiu de meio disponível comercialmente¹⁴ e foi usado de acordo com as instruções do fabricante. A diferenciação condrogênica foi determinada por coloração com azul Alciano.

Extração de corantes das colorações de diferenciação osteogênica e condrogênica

Realizou-se a extração dos corantes apenas nas linhagens isoladas mecanicamente.

Azul alciano: Após finalizar o protocolo de diferenciação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com metanol a -20°C por 1 minuto e lavadas com água destilada. Em seguida, incubaram-se em solução de azul Alciano em 1N HCl pH 0,2 durante a noite. Após

¹² GIBCO ® Invitrogen, Gent, Belgium

¹³ GIBCO ® Invitrogen, Gent, Belgium

¹⁴ GIBCO ® Invitrogen, Gent, Belgium

várias lavagens em água destilada, adicionaram-se 6M de guanidina HCL em água MilliQ, pH5,8, por 5 horas em temperatura ambiente. A placa foi lida em densidade óptica de 620 nm.

Vermelho de alizarina : Após finalizar o protocolo de diferenciação em placas de 96 poços, as células foram lavadas duas vezes com PBS. Após adicionaram-se 800 µl de ácido acético a 10% em cada poço e deixou-se em temperatura ambiente em agitador por 10 minutos. Após raspou-se a monocamada com a ponteira de 200 microlitros e transferiu-se para um tubo de polipropileno do tipo eppendorf com ácido acético a 10%. A solução foi ressuspensa em vórtex por 30 segundos e adicionaram-se 500 µl de óleo mineral e aqueceu-se o tubo a 85°C por 10 minutos. Em seguida o tubo foi transferido para o gelo, onde permaneceu por 5 minutos e centrifugado a 20.000 g por 15 minutos. Após removeram-se 500 µl de sobrenadante e a solução foi transferida para um novo tubo e adicionaram-se 200 µl de hidróxido de amônia e prepararam-se alíquotas de 150 µl para realizar a leitura em triplicada. Mensurou-se em densidade óptica de 405 nm.

2.3 Isolamento de RNA para quantificação de OCT-4 usando PCR em tempo real quantitativo

O RNA de cada clone foi extraído utilizando-se o reagente *Tri Pure*¹⁵ de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA usando o reagente para transcrição reversa Taq Man¹⁶ de acordo com as instruções do fabricante. O kit SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR com ROX¹⁷ foi utilizado para detectar a expressão de Oct4 em amostras de AFSC (FW: 5'-GATGGCGTACTGTGGGCC-3' 'RV: 5'-TGGGACTCCTCCGGGTTTTG-3') e o gene GAPDH (FW: 5'-CAATGCCAGCCCCAGCGTCA-3' 'RV: 5'-GCCTTCCGTGTCCCCACTGC-3) foi utilizado como gene de controle para normalizar os níveis de mRNA. O RNA extraído de hESC linha H9 e CT endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram obtidas a partir do *Stem Cell Institute of Leuven* (SCIL) e foram utilizado como controle positivo e negativo, respectivamente.

¹⁵ Roche Diagnostic, Vilvoorde, Belgium.

¹⁶ Applied Biosystem, Belgium.

¹⁷ GIBCO® Invitrogen, Gent, Belgium.

3 Manipulação das células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico

3.1 Transdução com vetores lentivirais (VL) expressando genes terapêuticos e repórteres

Para testar a funcionalidade de diferentes promotores nas hAFSC, utilizaram-se vetores lentivirais codificando eGFP sob controle dos promotores citomegalovírus (CMV), *Chimeric Chicken-Beta-Actin* (CBA), vírus formador de foco esplênico (SFFV) e CypA. A fim de selecionar as AFSCs transduzidas, uma tecnologia baseada em imunoseleção de CD34 foi utilizada. Uma transferência bicistrônica lentiviral de plasmídeo foi construída pela equipe de Vetores virais de Leuven, codificando eGFP e uma forma truncada da proteína transmembrana CD34 (tCD34), separadas por uma sequência peptídica 2A e sob o controle do promotor SFFV. Esse gene repórter foi convertido nos dois genes VEGF e HGF para o uso terapêutico. A sequência cDNA de VEGF e HGF foram amplificados por PCR usando como molde p-hVEGF e h HGF (HsCD00022276 e HsCD0005103, fornecido pelo banco de dados de plasmídeo de Harvard, Mass, EUA). Para isso, utilizou-se primers VEGF sense (5'-AAAATCTAGAATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTGG-3'), VEGF anti-sense (5'-GCAGATGTGACAAGCCGAGGCGGTGACTCGAGAAAA-3'), HGF sense (5'-AAAATCTAGAATGTGGGTGACCAAACCTCCTGCCA-3') e HGF anti-sense (5'-TTTTGTCGACCTATGACTGTGGTACCTTATATGTTA-3'). Os produtos amplificados foram digeridos com enzimas restritivas XbaI e XhoI para VEGF e XbaI e Sall para HGF, e ainda subclonados direcionalmente XbaI-XhoI ou XbaI-Sall do plasmídeo de transferência pSFFV-EGFP-T2A-tCD34, obtendo-se pSFFV-VEGF-T2A-tCD34 ou pSFFV-HGF-T2A-tCD34 (Figura 2). A construção obtida foi sequenciada para assegurar uma correta sequência de DNA (Tabela 2). O último plasmídeo de transferência genética utilizado nesse estudo codifica a β -galactosidase localizada no núcleo, sob o controle de promotor CBA.

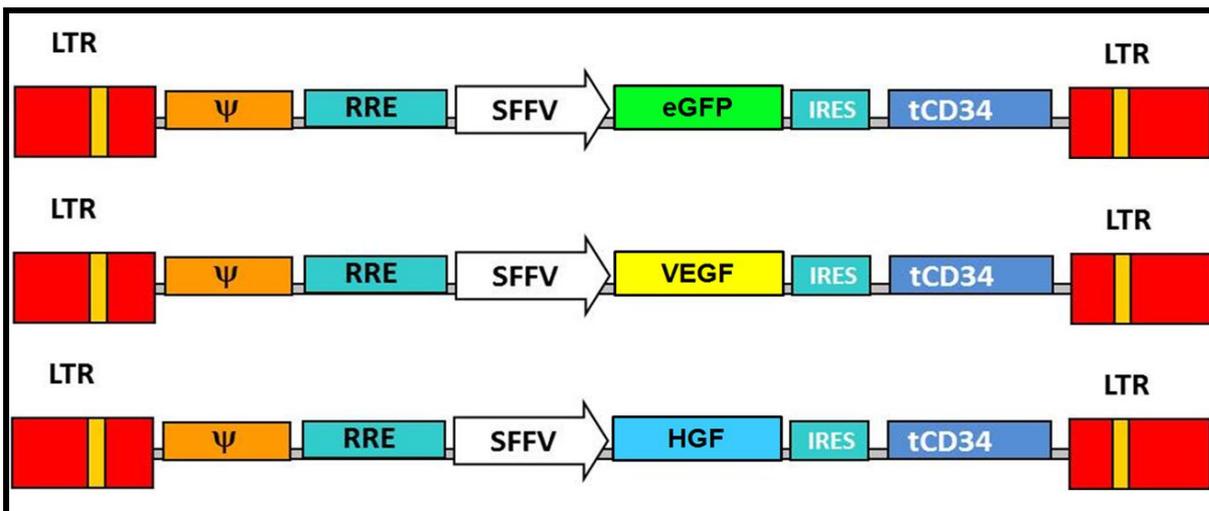


Figura 2: Construções dos plasmídeos usados expressando eGFP, VEGF e HGF, tendo como gene de seleção a forma truncada CD34 e tendo como promotor o SFFV. Sendo LTR, *long terminal repeat*; RRE, *rev response element* e IRES, *internal ribosome entry site*.

Para as experiências de transdução, semeou-se 10000 células por poço em uma placa de 96 poços de uma linhagem de hAFSC fortemente positivas para CD24 e CD117. No dia seguinte, as células foram transduzidas com preparações de vetores lentivirais diluídas em série, em meio Chang. Após 24 horas de incubação, os vetores foram removidos e o meio foi substituído por novo meio Chang sem vetores. As células foram passadas (1 para 3) por pelo menos 4 vezes para excluir pseudo-transdução.

Tabela 2: Primers usados para o sequenciamento de HGF e VEGF:

HGF	<p>sense: 5'-CTCCTGCATCTCCTCCTGCTCC-3'</p> <p>5'-GTCAGCCCTGGAGTTCCATGATA-3'</p> <p>5'-GATATCCCGACAAGGGCTTTGAT-3'</p>
VEGF	<p>sense: 5'-TTGCTGCTCTACCTCCACCATG-3'</p> <p>antisense: 5'-CTCGGCTTGTCACATCTGCAAGTA-3'</p>

4 Caracterização e avaliação da eficiência da transdução das células manipuladas

4.1 Identificação e imunoseleção de células transduzidas

As células transduzidas com eGFP-tCD34, VEGF-tCD34 e HGF-tCD34 foram identificadas por análise de citometria de fluxo utilizando-se como marcador o anticorpo PE

rato anti-humano CD34¹⁸. Para isolar as células CD34 positivas, a imunoseleção foi realizada utilizando um kit magnético de triagem para CD34¹⁹. A fração de células obtidas CD34 positiva foi semeada em placas de Petri e expandiu-se em diversas passagens para posterior análise.

4.2 Detecção da expressão do transgene usando-se imunofluorescência ou coloração X-gal

As hAFSCs (10.000 células por poço) foram plaqueadas em LabTek pelo período mínimo de 16 horas. No início do procedimento foram fixadas e permeabilizadas em solução de paraformaldeído a 2% com etanol a 50% durante 1 min à temperatura ambiente. Os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados com soro de burro²⁰ a 10% em PBS durante 20 min. Em seguida as células foram incubadas com anticorpo primário policlonal de coelho VEGF²¹ ou com policlonal de cabra HGF²² na concentração de 1:500 em PBS, a 4 ° C, durante a noite. Após três lavagens com PBS durante 5 min, as placas foram incubadas durante 1 h com anticorpo secundário (rato anticoelho Alexa 488 ou de burro anticabra Alexa 488, a uma concentração de 1:500 em PBS). Depois disso, as lâminas foram montadas com Hoechst 1:1000 em meio Mowiol. A expressão de VEGF e HGF foi analisada por microscopia confocal²³.

As AFSC LacZ positivas foram identificadas através de coloração histoquímica por X-gal²⁴. As células foram fixadas em formaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% durante 2 min e subsequentemente incubadas durante a noite a 37°C com solução X-gal, o que resulta em um precipitado insolúvel azul. As células foram contrastadas com paracarmina e montadas em Mowiol.

4.3 Detecção da expressão do transgene usando ELISA

Para detectar a concentração extracelular de proteína VEGF no meio de cultura, realizou-se o teste ELISA. As AFSC transduzidas com pSFFV-EGFP-T2A-tCD34 (controle) ou pSFFV-VEGF-T2A-tCD34 foram semeadas a uma densidade de 10⁴ células por cm² de uma placa de 6 poços e cultivadas em DMEM com 5% de FBS a 37 ° C em incubadora com

¹⁸ BD Bioscience, Becton, Dickinson and Company, Belgium

¹⁹ CD34 Kit humano, MACS, Miltenyi Biotec, Leiden, The Netherlands

²⁰ Dako, Heverlee, Belgium

²¹ VEGF A-20 SC-125, Santa Cruz Biotechnology, USA

²² AF-294-NA, R&D system, Belgium

²³ LSM 510 um, Zeiss, Zaventem, Belgium.

²⁴ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside #745-740– Boehringer Mannheim, Belgium

5% de CO₂ até chegar a 70-80% de confluência. Após fixação durante a noite, o meio foi substituído e as células foram cultivadas durante mais 24h antes de o meio ter sido recolhido para análise. O sobrenadante foi diluído em 1:10 em tampão de revestimento (50 mM pH Na₂CO₃ pH 9,6) e foi adicionado aos poços de uma placa de ELISA para incubação durante a noite a 4 ° C. Após, o meio foi removido e lavado com solução PBS/Tween 0,1% e a placa foi incubada durante 1 h à temperatura ambiente com solução de bloqueio (1% de BSA em PBS) e mantida em agitador. Após lavagem em PBS + 0,1% de Tween, a placa foi incubada durante 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo primário VEGF²¹ na concentração de 0,01 µg / poço. Após, o anticorpo secundário biotilado suíno anti IgG de coelho²⁵ diluído na concentração 1:1000 em PBS-1% BSA foi deixado reagir à temperatura ambiente durante 1 hora e incubado com streptavidina-HRP²⁶ diluído na concentração de 1:1000 em PBS/ 0,1% BSA por 30 min. A placa foi lavada usando PBS+Tween 0,1% (5 vezes) e incubada com solução de TMB Ultra²⁷ durante 20 min em câmara escura. A reação foi interrompida com solução de 2M H₂SO₄ e em seguida mensurou-se a absorvância (450-540 nm) da placa em leitor de ELISA²⁸.

4.4 Expressão de VEGF e HGF por PCR em tempo real

O RNA de células transduzidas foi extraído utilizando-se o reagente *Tri Pure*¹⁵ de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA usando o reagente para transcrição reversa Taq Man¹⁶ de acordo com as instruções do fabricante. O aparelho ABI Prism 7000²⁹ foi utilizado para avaliar a reação. O kit SuperScript™ III Platinum ® SYBR ® Green One-Step qRT-PCR com ROX¹⁷ foi utilizado para detectar a expressão de HGF (FW: 'RV: 5'-GCCTTGCAAGTGAATGGAAGTCCT-3' 5'-TCCCCATCGCCATCCCCTAT-3) e expressão do VEGF nas amostras de AFSC (FW: 5'-ATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGC-3 'RV: 5'-TGATTCTGCCCTCCTCCTTCTGC-3'). Utilizou-se como gene de manutenção para normalizar os níveis de mRNA o gene GAPDH (FW: 5'-GCCTTCCGTGTCCCCACTGC-3 'RV: 5'-CAATGCCAGCCCCAGCGTCA-3'). As condições utilizadas foram de 2 min a 50 ° C, 2 min a 95 ° C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 ° C, 60 segundos a 60 ° C e 1 min a 40 ° C. Os produtos de PCR foram

²⁵ E0353, DAKO, Heverlee, Belgium

²⁶ DAKO, Heverlee, Belgium

²⁷ eBioscience, Viena, Austria

²⁸ Multiskan FC, Thermo Scientific

²⁹ Applied Biosystem, Belgium

separados eletroforeticamente aplicados em um gel de agarose a 2% para confirmar a reação e analisar o tamanho dos fragmentos amplificados.

4.5 Caracterização das AFSCs após manipulação genética

Após a transdução avaliaram-se eventuais alterações da morfologia, da imunofenotipagem e do potencial de diferenciação nas células transduzidas com VEGF e HGF, utilizando os mesmos protocolos descritos anteriormente.

5. Estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Os dados foram analisados pelo método não paramétrico Kruskal-wallis, seguido de pós-teste de Dunn.

RESULTADOS

1 Isolamento e seleção das células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico

No dia 3 da cultura primária das amostras independentes do líquido amniótico, observou-se um pequeno número (em média 4 a 8) de células isoladas aderidas em áreas distintas da placa Petri. Houve contaminação do líquido amniótico em 3/24 amostras quando colocadas em cultura.

Imunoseleção para c-Kit

As células de três amniocenteses foram submetidas ao protocolo de imunoseleção para c-Kit (CD117) como descrito por DE COPPI et al. (2007). Não foi observada nenhuma diferença morfológica entre as AFSCs c-Kit⁺ e as cKit⁻. Em ambas havia uma mistura de células com formato alongado e arredondado (Figura 3)

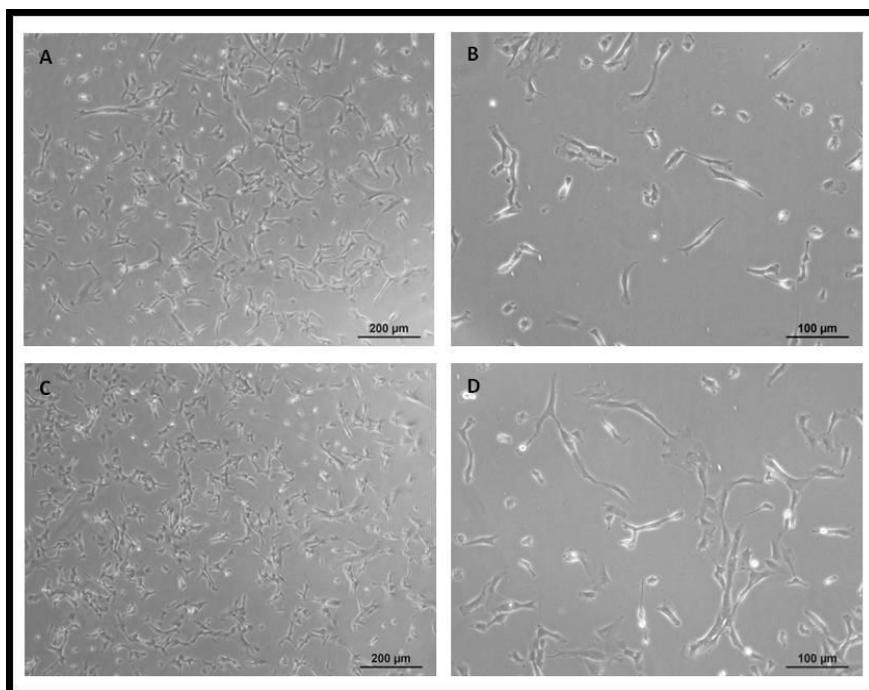


Figura 3. As células estromais mesenquimais do líquido amniótico derivadas da Imunoseleção para c-Kit: CD117 positivas (A) e (B) e CD 117 negativas (C) e (D).

Seleção Mecânica ou por “célula de partida”

Realizou-se o isolamento mecânico de linhagens clonais de AFSC em 18 amostras de líquido amniótico, sendo 2 a 3 amostras de cada semana gestacional (15 a 22 semanas). A

derivação de linhagem de células clonais usando o protocolo de seleção mecânica foi bem sucedida em 79 dos 104 clones produzidos. Os outros 25 clones pararam de crescer após poucas semanas em cultivo.

Após o plaqueamento do líquido amniótico, cada colônia derivou do crescimento de uma única célula; estas células foram denominadas como "células de partida". Depois de permitir o crescimento em meio Chang durante 48 h, cada célula de partida formou uma colônia, a qual continha, em média, cerca de 100-300 células (Figura 4). As células foram mecanicamente selecionadas a partir de uma colônia de células com morfologia idêntica. Selecionaram-se apenas células de colônias que fossem oriundas de um único clone.

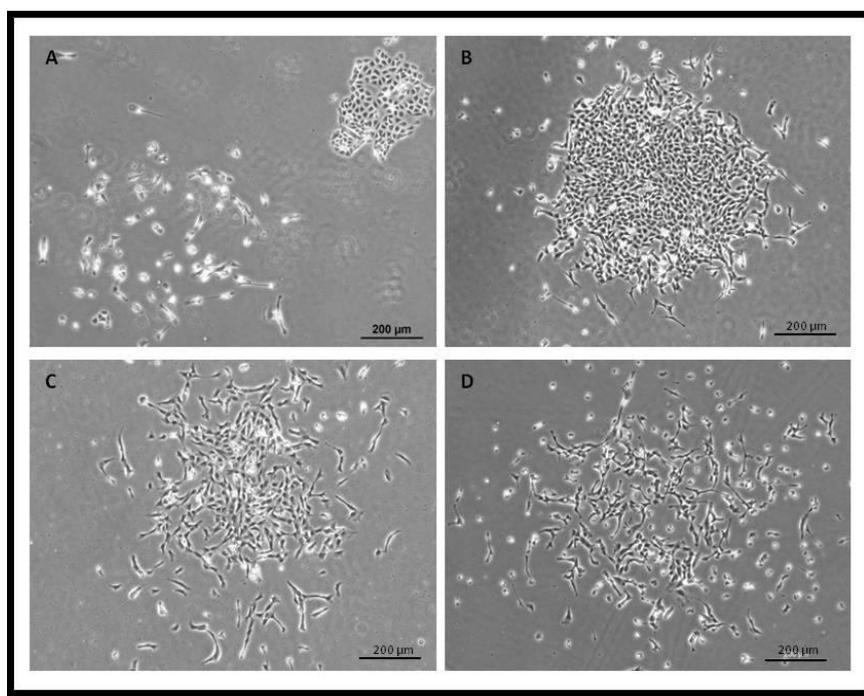


Figura 4. Aparência das colônias formadas após plaqueamento do líquido amniótico e em fase de realização da seleção mecânica: colônia em fase inicial (A) e colônias em fase de transferência para a placa de 96 poços (B, C, D).

As colônias foram removidas independentes e ressemeadas em uma placa de cultura de 24 poços, sendo denominada de passagem 1. As AFSCs clonais atingiram a confluência de 70% (cerca de 30,000-35,000 células) em 3-4 dias após a primeira semeadura. As AFSCs puderam ser expandidas até 100 células dentro de uma semana e, subsequentemente, cultivadas à passagem 2 em um frasco de cultura de 25 cm² e, em seguida, 75 cm² frascos de cultura. Utilizando-se este método, um milhão de células a partir de uma população clonal de AFSCs podem ser derivadas no prazo de duas semanas. Após a expansão, os clones

consistiram de uma população mista onde ambas morfologias alongadas e arredondadas estavam presentes, mas depois de várias passagens em cultura, o formato alongado tornou-se mais frequente (Figura 5). As AFSC foram expandidas de 4-40 passagens dependendo da potencialidade de expansão e sobrevivência dos clones (Figura 6).

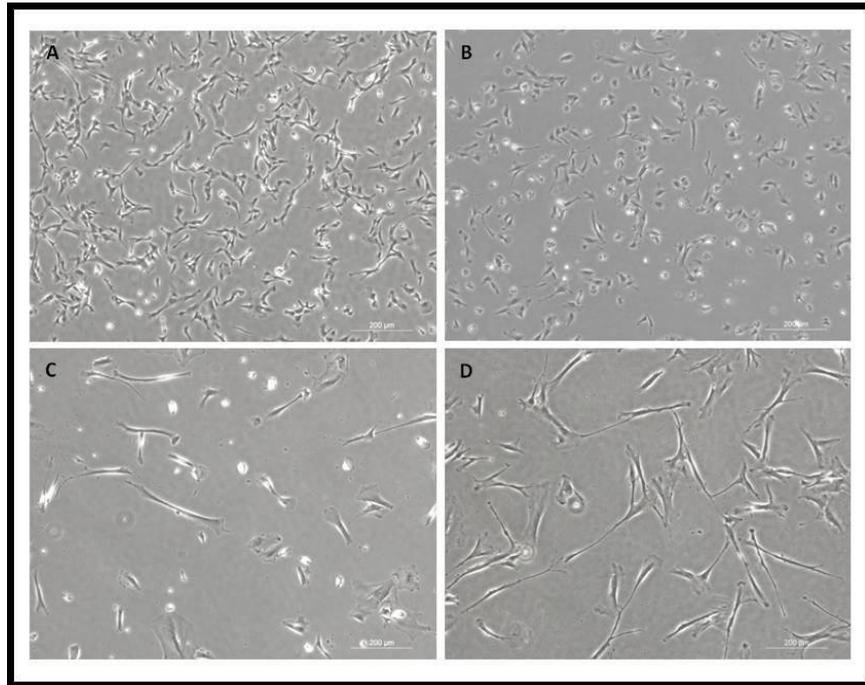


Figura 5. Exemplo de diferentes populações de hAFSC selecionadas mecanicamente em passagem 4 de cultura. (100 e 200X).

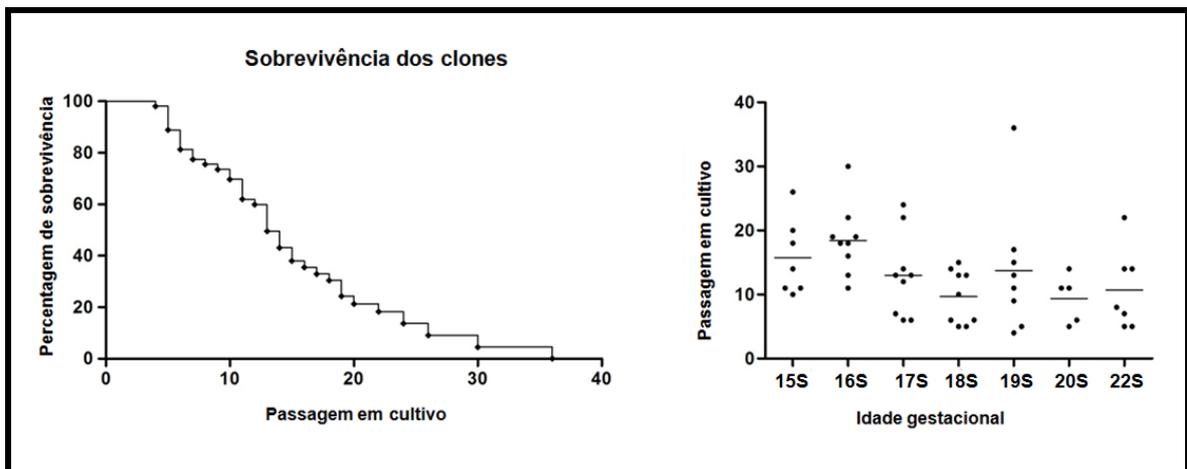


Figura 6: Curva de sobrevivência dos clones das hAFSCs. A idade gestacional foi descrita em semanas.

2. Caracterização das AFSCs

Citometria de fluxo (FACS)

Características antigênicas da hAFSCs isoladas a partir de todas as amostras de líquido amniótico, selecionadas tanto imunologicamente como mecanicamente, foram analisadas por citometria de fluxo. Quase todos os clones foram negativos para os marcadores hematopoiéticos CD34, CD45 e HLA-DR com duas exceções (ambos os clones derivados mecanicamente). As hAFSC foram positivas para os marcadores mesenquimais CD105, CD73 e CD90, para a molécula de adesão CD44, CD29 e de HLA-ABC. A expressão de CD117 foi baixa em todas as amostras independente da idade gestacional, exceto por um pequeno aumento na expressão, na semana 19. O CD 24 foi elevada em apenas algumas linhagens. A imunofenotipagem dos clones celulares isolados mecanicamente está representada na Figura 7. A análise da relação de volume celular (*Forward scatter plot*, FSC) e complexidade interna das células (*Side scatter plot*, SSC) demonstrou que amostras obtidas por seleção mecânica consistiram numa população mais homogênea do que as das amostras selecionadas para c-Kit (Figura 8).

IMUNOFENOTIPAGEM DE 79 CLONES AFSC

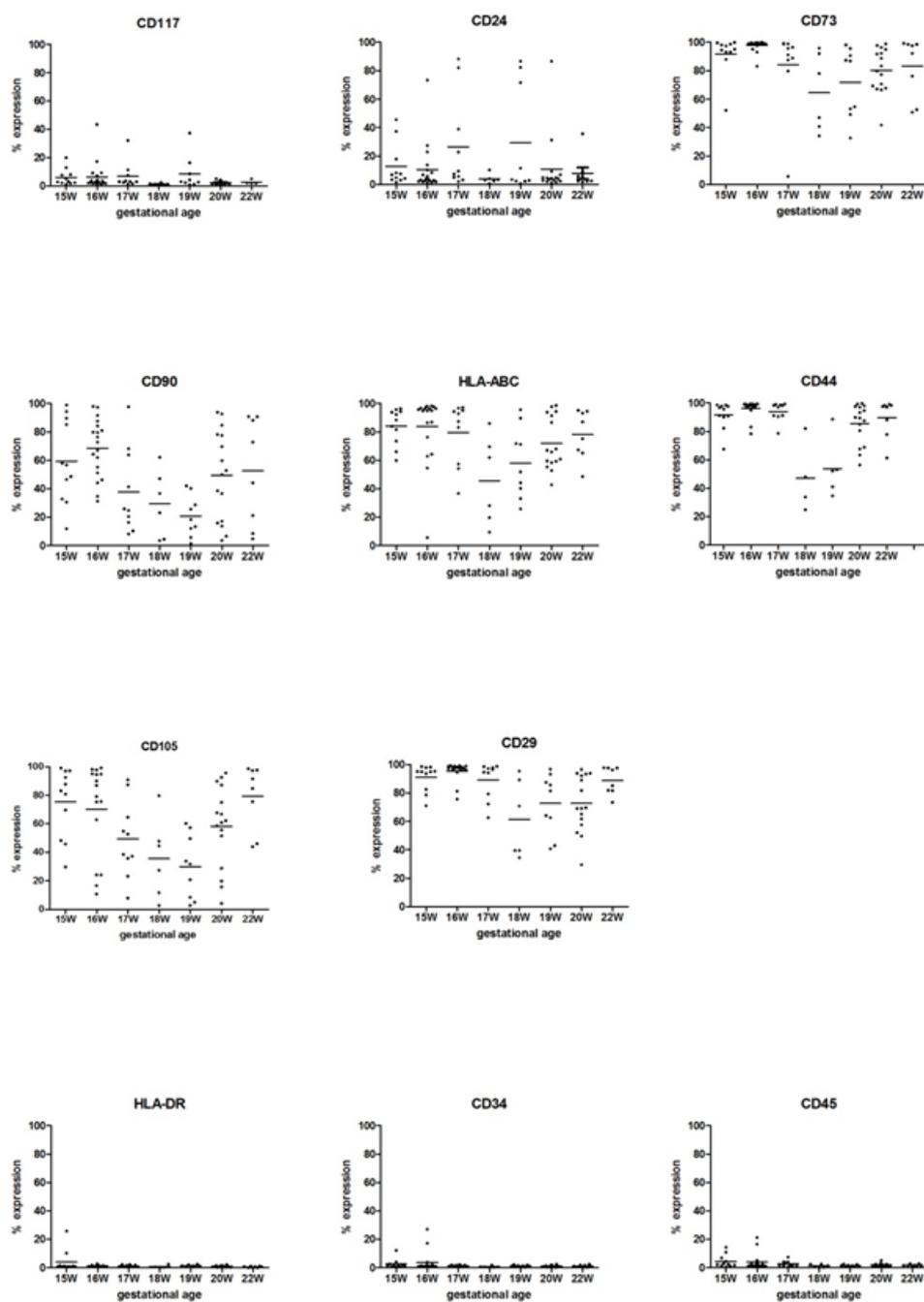


Figura 7. Imunofenotipagem analisados por citometria de fluxo nos 79 clones de células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano isolados mecanicamente de amostras de amniocentese.

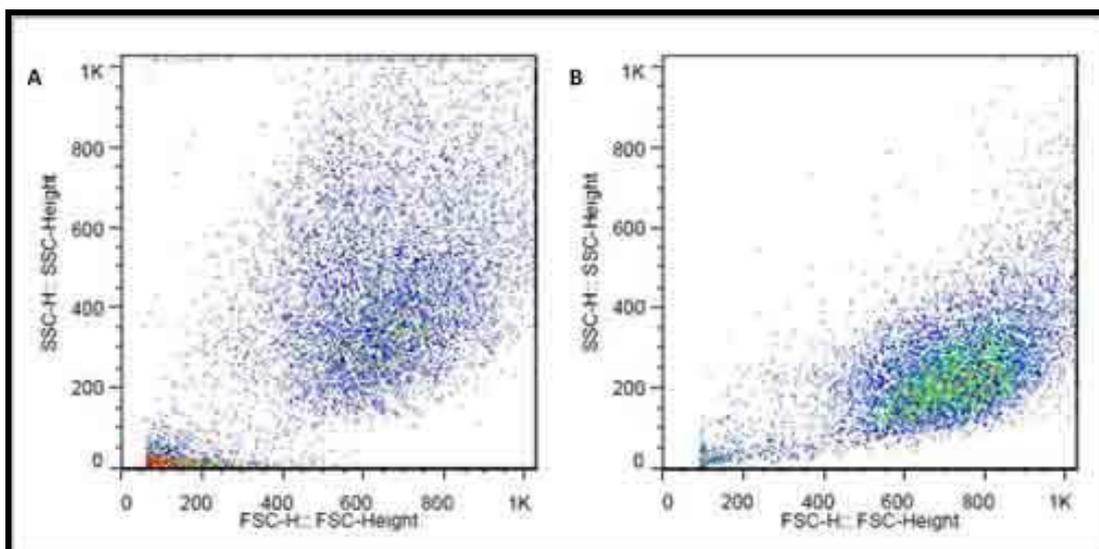


Figura 8. Análise de citometria de fluxo para avaliar o volume celular e a complexidade interna das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano isoladas por imunoseleção (A) e mecanicamente (B).

Ensaio de diferenciação

As hAFSCs foram cultivadas com meio específico para diferenciação em linhagens adipogênica e osteogênica usadas em hAFSC selecionadas pelos diferentes métodos, das semanas 15-22 de gestação. Em ambos protocolos, as hAFSCs foram capazes de se diferenciar nas linhagens adipogênica e osteogênica, determinada por Oil red O (Figura 10) e vermelho de alizarina (Figura 11). A indução da diferenciação condrogênica foi realizada apenas nas amostras selecionadas mecanicamente de 15-20 semanas de gestação e resultou em colorações de azul alciano positivas (Figura 12).

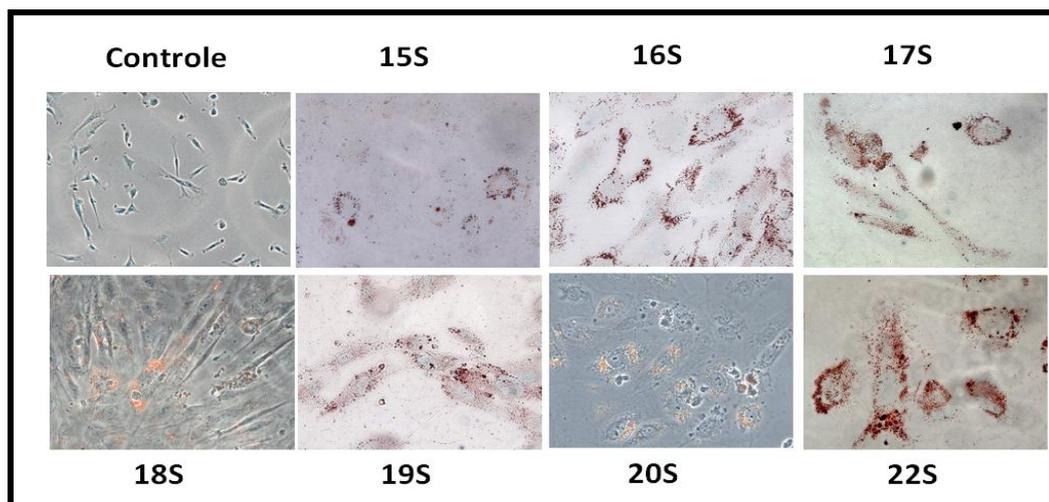


Figura 9. Coloração de Oil redO para detectar diferenciação adipogênica nas células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano derivadas de diferentes semanas de gestação, objetiva 100X.

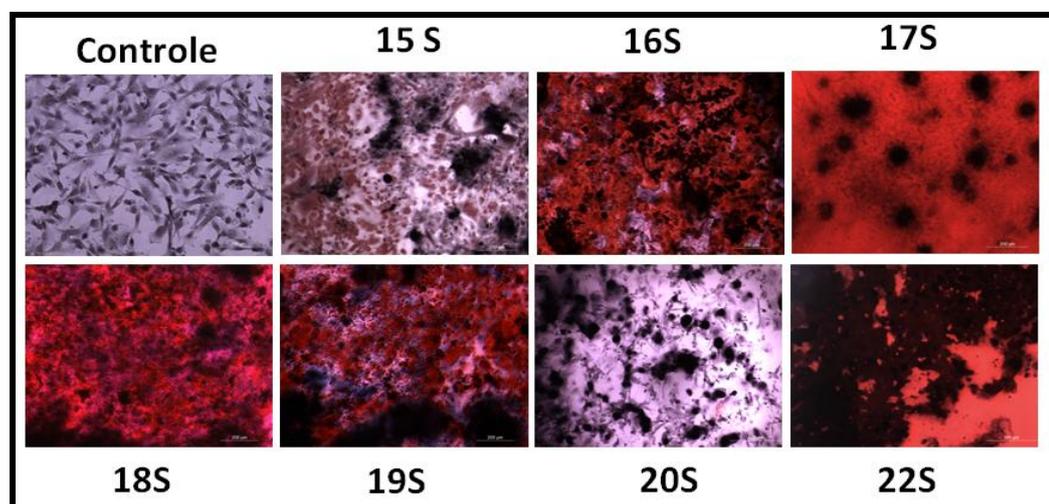


Figura 10. Coloração de vermelho de alizarina para detectar diferenciação osteogênica nas células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano derivadas de diferentes semanas de gestação, objetiva 100X.

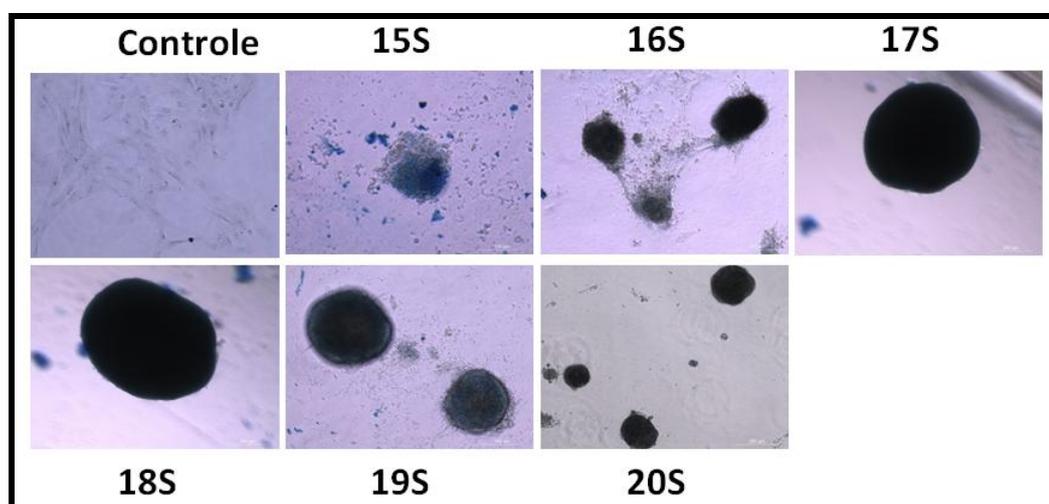


Figura 11. Coloração de azul alciano para detectar diferenciação condrogênica nas células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano derivadas de diferentes semanas de gestação, objetiva 100X.

Extração de corantes das colorações vermelho de alizarina e azul alciano

Após diferenciação osteogênica, detectou-se um aumento significativo na quantidade de corante nas amostras com hAFSCs derivadas das amostras de 16 a 22 semanas gestacionais (Figura 12). E após diferenciação condrogênica pode-se detectar um aumento significativo em amostras de todas as semanas gestacionais avaliadas (Figura 13).

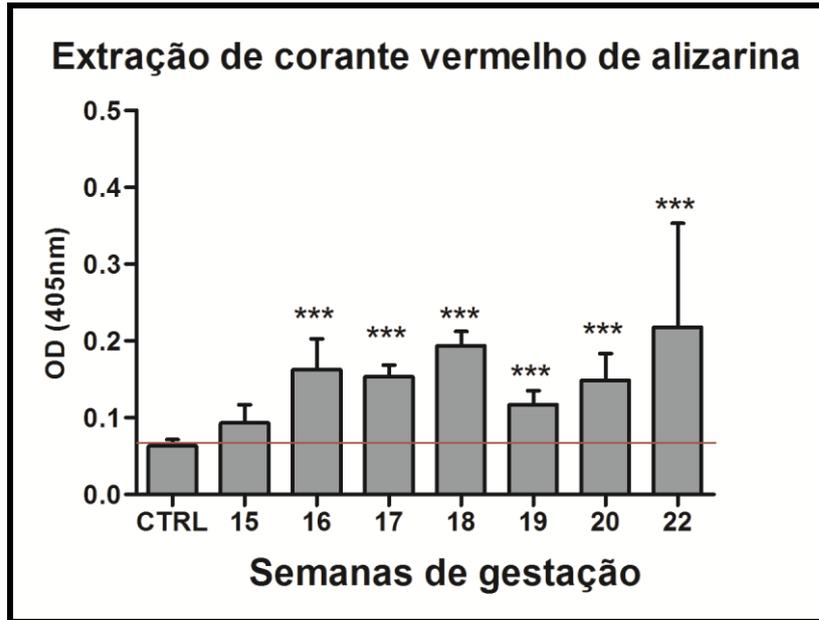


Figura 12. Extração de corante vermelho de alizarina nas amostras de células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano de diferentes semanas de gestação, induzidas à diferenciação osteogênica.

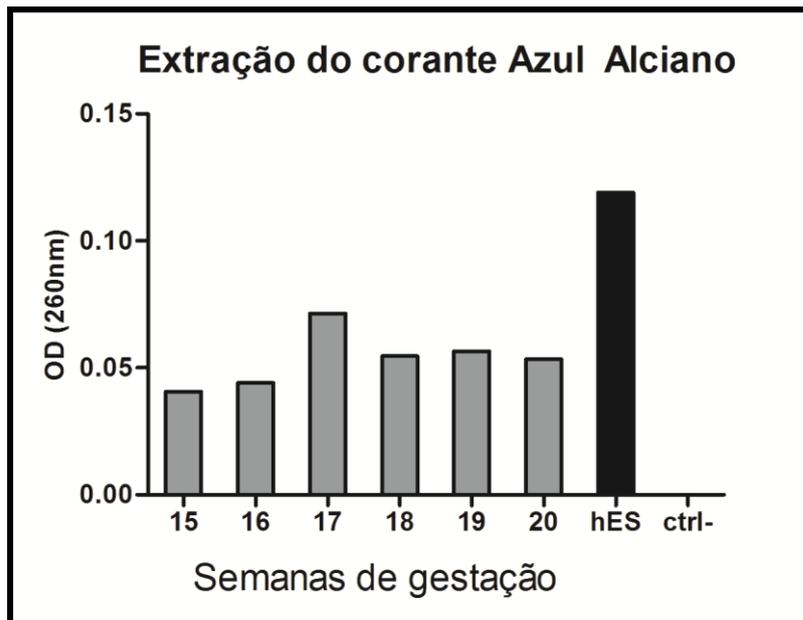


Figura 13. Extração de corante azul alciano nas amostras de células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano de diferentes semanas de gestação, induzidas à diferenciação condrogênica, grupos separados em semanas e hAFS sem indução de diferenciação e células tronco embrionárias (hESC) utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente.

PCR em tempo Real quantitativo

Para avaliar a pluripotencialidade das hAFSC foi realizado PCR-RT quantitativo para detectar a expressão de Oct4, um marcador de células estaminais embrionárias envolvido na manutenção da pluripotência das células-tronco *in vitro* e *in vivo*.

As hAFSC mecanicamente selecionadas foram investigadas para a expressão de Oct-4. Vinte e três dos 43 clones - derivados de diferentes idades gestacionais (15, 16, 17, 18 e 19) - foram testados e 50% eram ligeiramente positivos em relação ao controle negativo, uma linhagem de células de fibroblastos de tumor de ovário (Figura 14) .

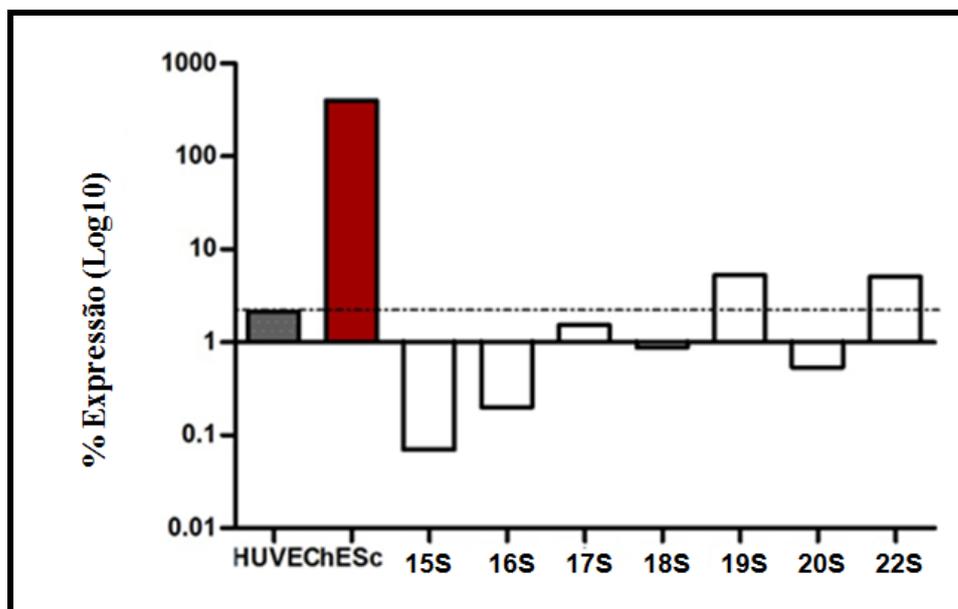


Figura 14: Expressão de Oct-4 nas células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano de diferentes semanas de gestação. Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e células tronco embrionárias humanas (hESC) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

3. Manipulação

Transferência genética mediada por lentivírus nas AFSCs

As hAFSC puderam ser convertidas em um sistema de transferência de genes terapêuticos pela manipulação genética. Neste estudo utilizou-se uma plataforma de vetor lentiviral para a introdução de genes repórteres e terapêuticos em diferentes linhagens de células. Para investigar a eficiência de transdução de vetores lentivirais nas hAFSCs foram

utilizados os genes repórteres de proteína verde fluorescente (eGFP) e β -galactosidase (lacZ). Foram investigadas as seguintes variáveis: adição de transdução de sulfato de protamina como potencializador, eficiência do promotor, imunoseleção para tCD34 e o efeito da transdução na expressão CD das hAFSCs.

Em uma experiência inicial a eficiência de transdução de vetores lentivirais das AFSC foi investigada em condições normais e sob a adição de sulfato de protamina. Este último resultou num ligeiro aumento da eficiência da transdução (em média 10%, dados não mostrados). A análise de citometria de fluxo para a expressão de eGFP nas células foi utilizada como uma medida do resultado.

Em seguida, transduziram-se as hAFSC usando vetores virais sob o controle de diferentes promotores. Na análise de citometria de fluxo as unidades transdutoras e a intensidade médias de fluorescência foram utilizadas como medidas de resultados. Todas as preparações de vetores foram normalizadas em ELISA p24 (títulos não-funcionais). Como demonstrado na figura 15, o promotor CMV resultou na expressão mais elevada de eGFP, seguido pelos promotores SFFV, CypA e CBA.

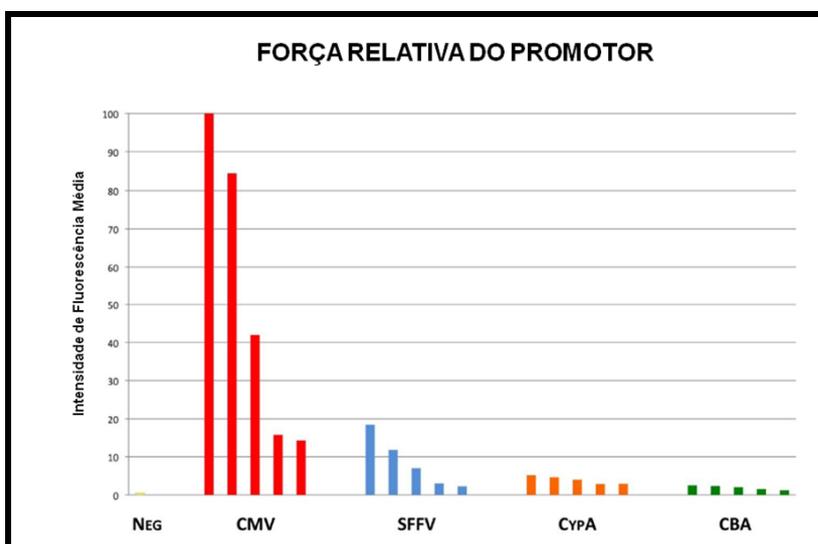


Figura 15. Força relativa dos promotores CMV, SFFV, CypA e CBA estão representadas pela intensidade média de fluorescência de vetores expressando eGFP.

Utilizou-se também um outro gene repórter nas hAFSCs. As células que expressaram LacZ puderam ser facilmente identificadas em secções de tecido para detecção tecidual em experiências com animais. O lac-Z possui a vantagem de ser mais confiável, no entanto as células se tornam inviáveis após a coloração x-gal além de ser mais trabalhoso do que a detecção eGFP, a qual é rapidamente detectada sob a luz de um microscópio de

imunofluorescência. A eficiência de transdução pôde ser realizada pela contagem de células positivas após a coloração por X-gal (Figura 16). Observou-se cerca de 80% de positividade para Lac-z após transdução (Figura 17).



Figura 16. Coloração de X-Gal para detectar a atividade de β -Galactosidase em células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com vetor lentiviral expressando o gene reporter Lac-Z.

Para analisar as AFSC transduzidas com eGFP-tCD34, VEGF-tCD34 e HGF-tCD34, a expressão de eGFP, e de proteína CD34 foram detectadas por coloração de imunofluorescência (Figura 21) e citometria de fluxo (Tabela 3), respectivamente. Para aumentar o número de células tCD34+ em cultura, um protocolo de imunoseleção foi realizado para esse marcador, resultando em um aumento da porcentagem de células marcadas. O número de células eGFP-tCD34 aumentou de 46,6 para 93,7% após imunoseleção. Após a transdução das hAFSC-HGF, obteve-se 19,2% de células positivas para o marcador CD34, aumentando para 53% de células positivas após a imunoseleção, no entanto após algumas semanas em cultivo (p28) houve uma queda novamente para 5,6% de células CD34+. Já na linhagem transduzida com VEGF, os valores foram de 58,3%; 80,9% e 92,3%, logo após a transdução, pós imunoseleção e 28 passagens em cultivo, respectivamente.

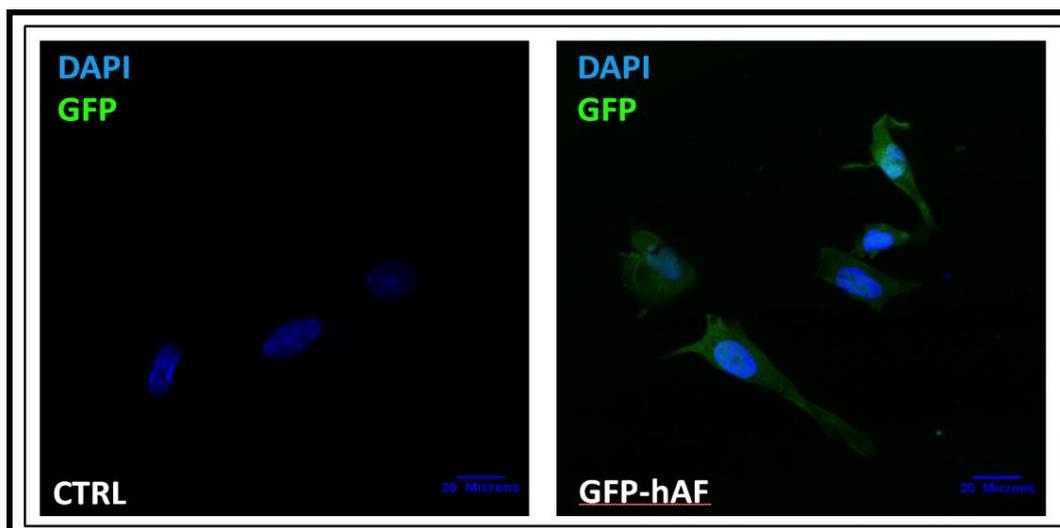


Figura 17. Expressão de GFP em células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com vetor lentiviral expressando o gene reporter eGFP.

Tabela 3. Imunofenotipagem das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas em diferentes tempos em cultura

Marcador CD	Clone hAFSC	hAFSC HGF pós-transdução(p.14)	hAFSC HGF (p.29)	hAFSC VEGF pós-transdução(p.14)	hAFSC VEGF (p.29)
CD117	37,2	18,4	1,18	5,05	4,87
CD24	82,4	46,3	9,9	16,3	45,9
CD90	1,54	53,2	11,8	28,8	7,33
CD73	86,9	83,1	95,7	98,3	97,9
HLA-ABC	51,9	80,4	78,4	86,5	90,2
CD44	89,3	86,4	94,7	88,4	97,8
CD29	85,6	90,6	89,1	91,3	47,1
CD105	57,3	70,3	60,7	71,2	96,8
HLA-DR	1,32	6,79	0,7	1,69	1,87

4. Caracterização das hAFSC modificadas geneticamente para VEGF e HGF

Para detectar a expressão de VEGF e HGF nas células transduzidas realizou-se PCR-RT (expressão de mRNA), imunofluorescência e ELISA (expressão protéica).

A análise de PCR-RT mostrou que a expressão de mRNA para VEGF aumentou 121 vezes nas células AFSC-VEGF comparado às AFSCs não transduzidas. Já a expressão de mRNA para HGF aumentou 4451 vezes nas hAFSC transduzidas com HGF comparadas às

não transduzidas (Figura 18). O nível de secreção de VEGF no meio de cultura foi mensurado por ELISA, demonstrando um aumento de 50 vezes nos níveis de VEGF comparado às hAFSC não transduzidas (Figura 19).

Para demonstrar a localização intracelular das proteínas VEGF e HGF, realizou-se imunofluorescência, sendo visualizado o aumento da expressão por microscópio confocal (Figura 20).

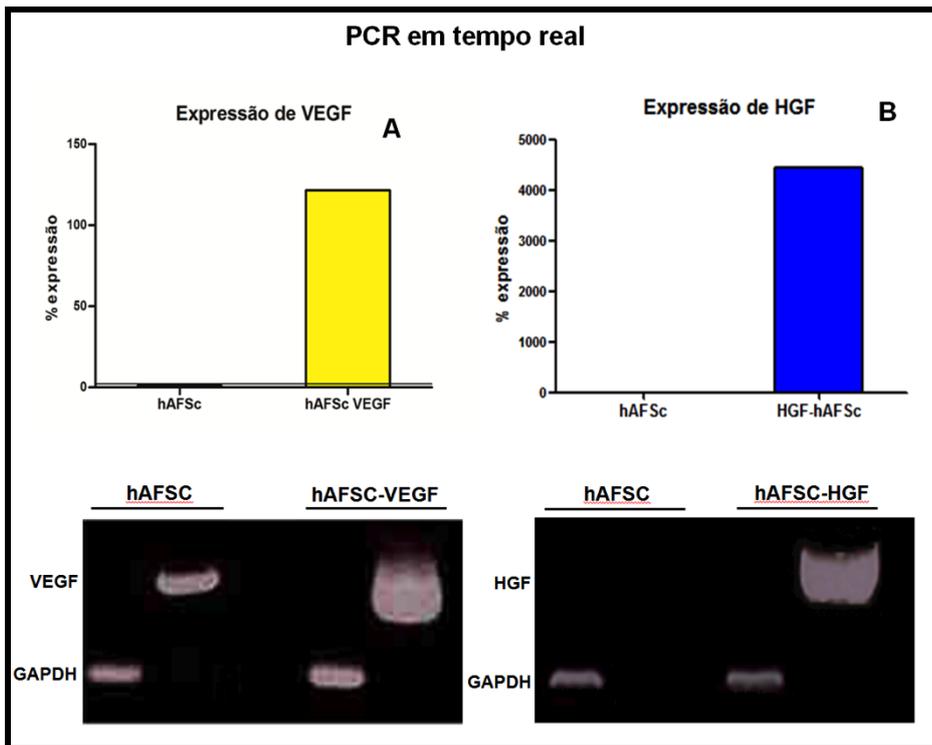


Figura 18. Confirmação da superexpressão dos genes VEGF (A) e HGF (B) pela análise de PCR em tempo real das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas.

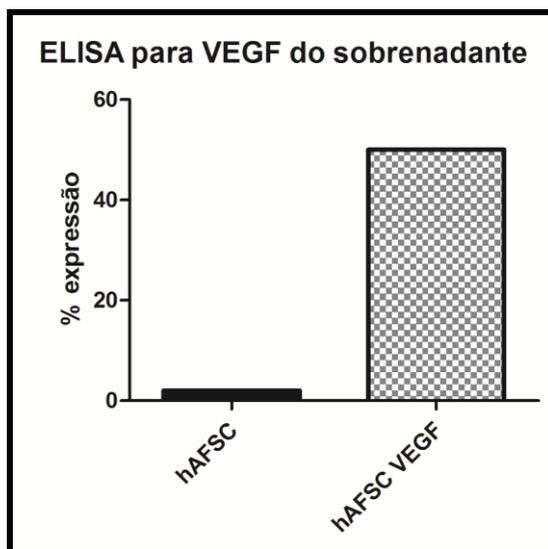


Figura 19. Expressão protéica de VEGF nas células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano não transduzidas e transduzidas com VEGF.

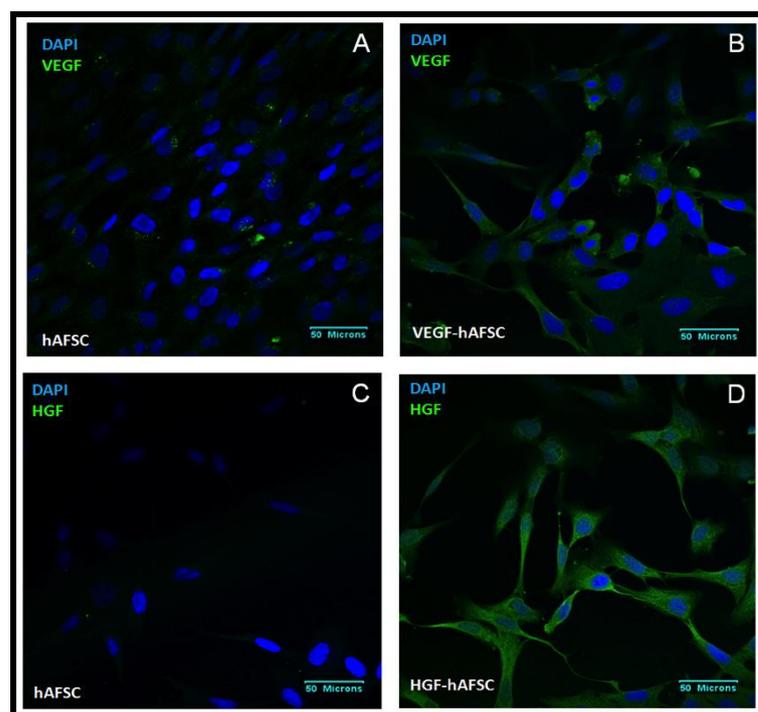


Figura 20. Imunofluorescência para detectar a expressão de VEGF nas células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano não transduzidas (hAFSC) (A) e transduzidas com VEGF-tCD34 (B) e de HGF nas hAFSC não transduzidas (C) e transduzidas com HGF-tCD34 O núcleo foi contracorado com Hoechst.

Uma vez que a manipulação genética de uma linhagem de células pode introduzir alterações morfológicas ou funcionais, investigaram-se a morfologia, a expressão de moléculas de superfície (CD) e capacidade de diferenciação das hAFSC transduzidas. Morfologicamente as células transduzidas permaneceram uma população homogênea semelhante a fibroblastos. À análise de citometria de fluxo, demonstrou-se que as células permaneceram expressando os marcadores mesenquimais CD105 e CD73 e CD90, moléculas de adesão CD44, CD29 e HLA-ABC e permaneceram negativas para os marcadores hematopoiéticos CD34, CD45 e para HLA-DR (Figura 21 e 22), no entanto observou-se ligeira redução no tamanho celular das hAFSCs transduzidas com VEGF e um aumento das células transduzidas com HGF (Figura 23). Todas as células transduzidas mantiveram a sua capacidade de se diferenciarem em adipócitos, condrócitos e osteócitos (Figura 24).

Imunofenotipagem hAFSC-HGF

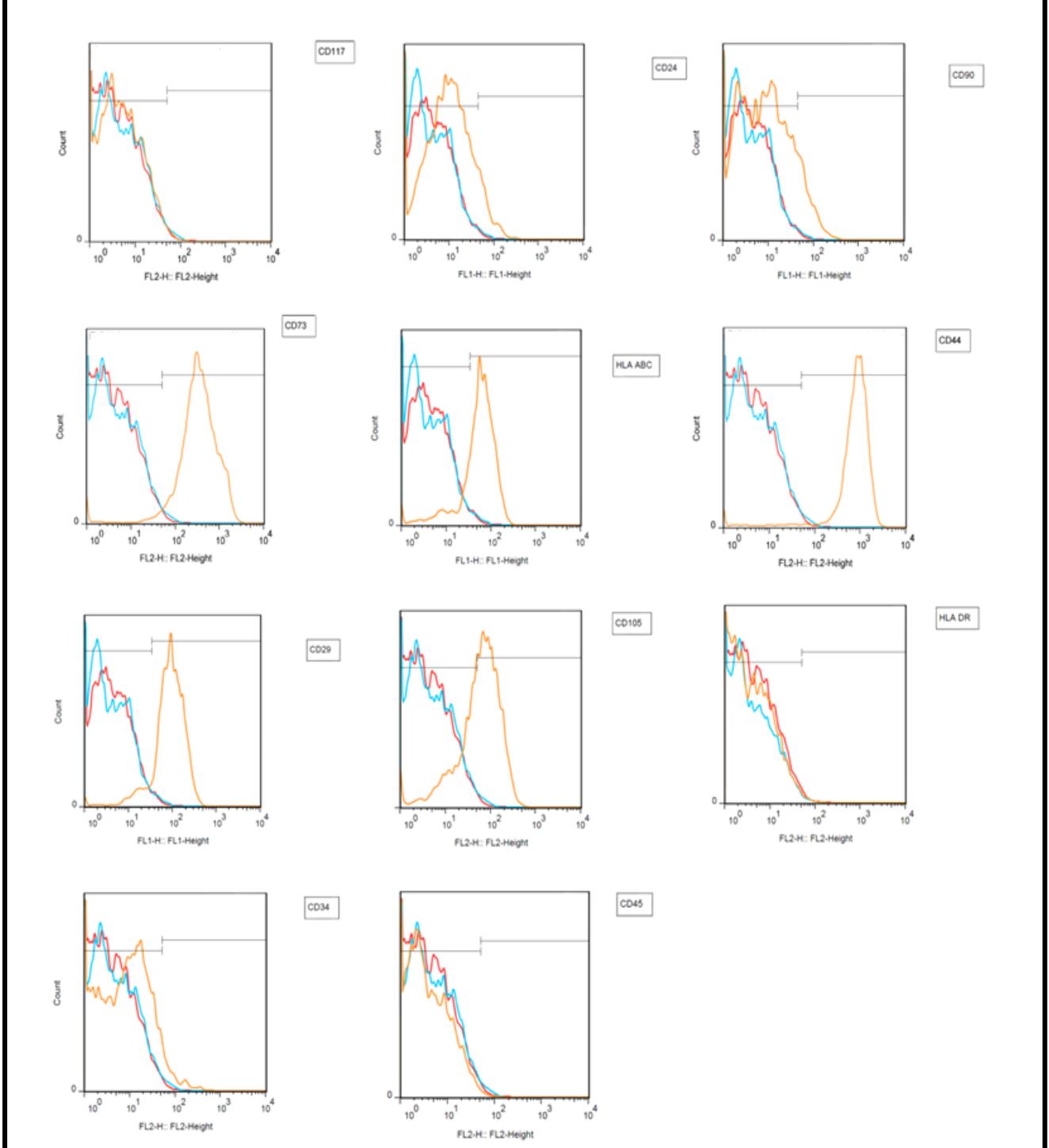


Figura 21. Citometria de fluxo para CD117, CD24, CD90, CD73, HLA-ABC, CD44, CD29, CD105, HLA-DR, CD 34 e CD 45 das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com HGF.

Imunofenotipagem hAFSC-VEGF

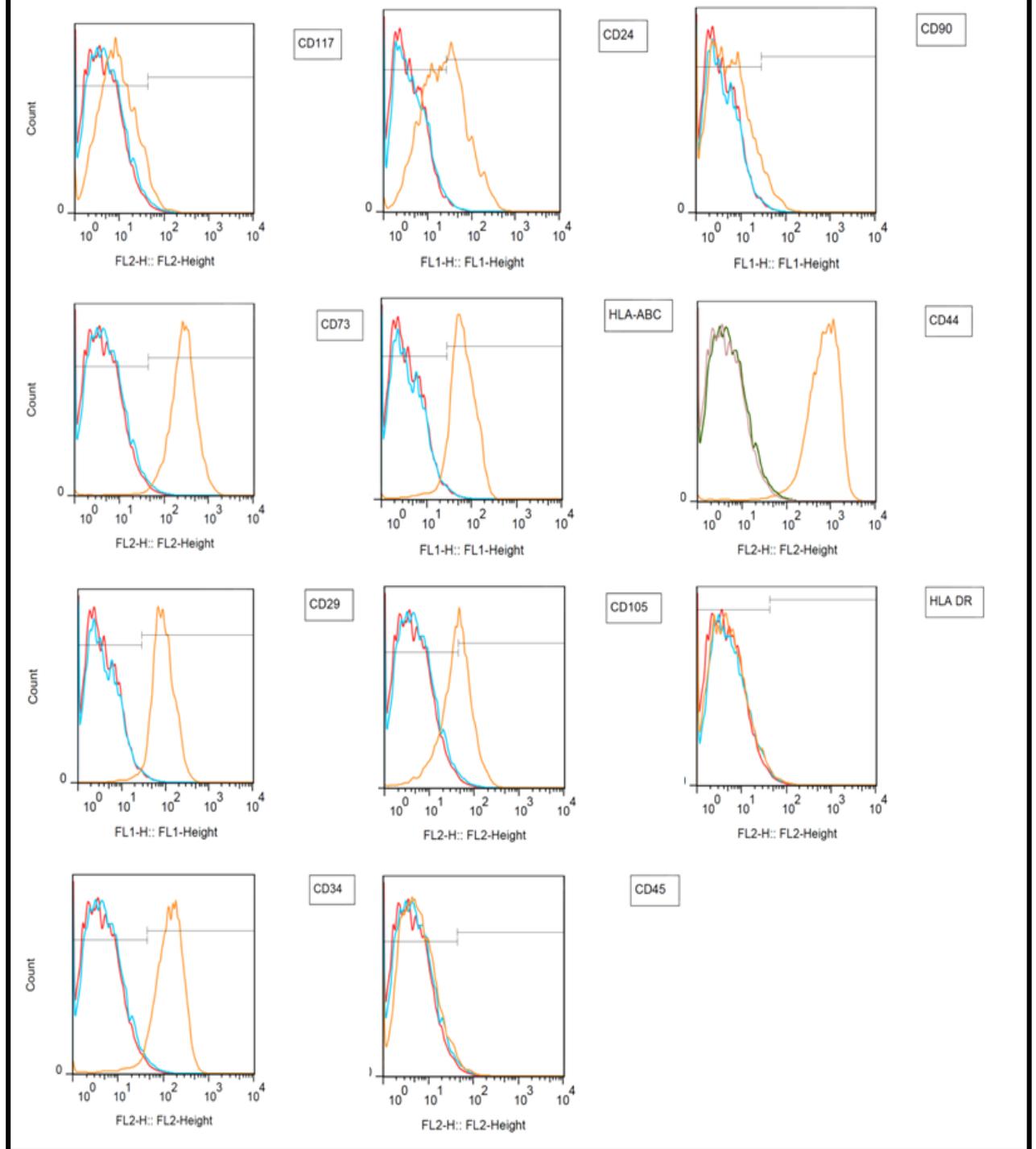


Figura 22. Citometria de fluxo para CD117, CD24, CD90, CD73, HLA-ABC, CD44, CD29, CD105, HLA-DR, CD 34 e CD 45 das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com VEGF.

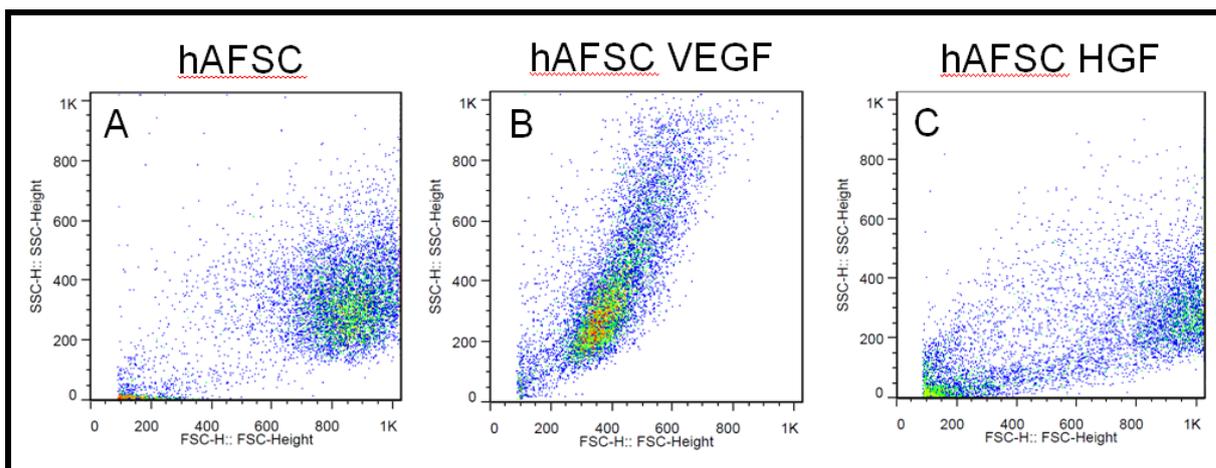


Figura 23. Análise de citometria de fluxo para avaliar o volume celular e a complexidade interna das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano (A) e após transdução com VEGF (B) e HGF (C).

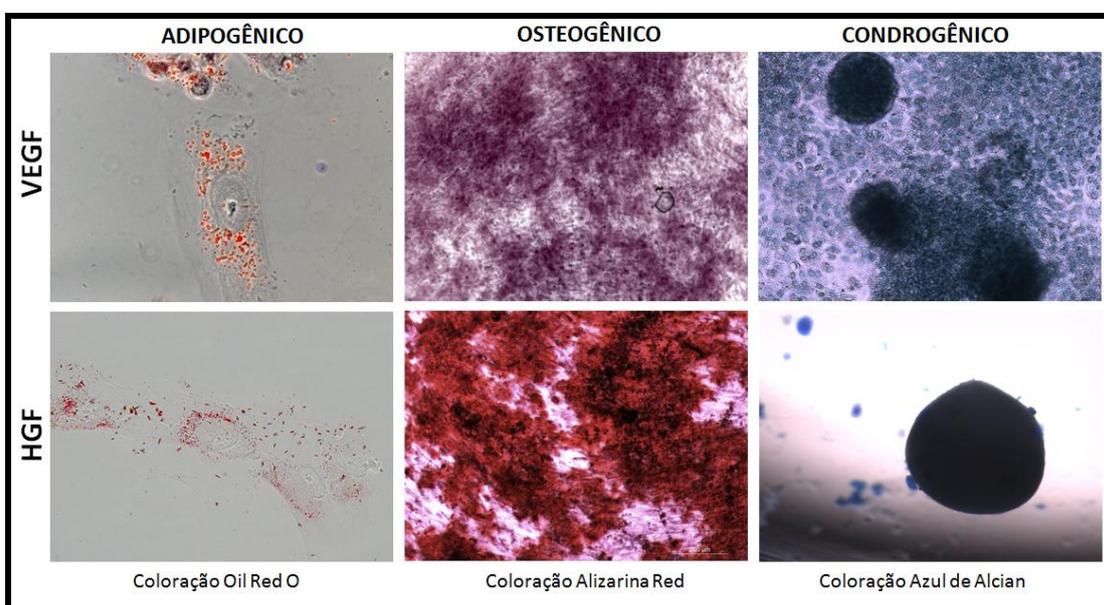


Figura 24. Diferenciação das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com VEGF e HGF em linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas.

Houve um aumento na extração de corante vermelho de alizarina (Figura 25) nas hAFSC transduzidas com VEGF após protocolo de diferenciação. Na análise de extração do corante azul alciano observou-se um aumento na intensidade tanto das hAFSCs transduzidas com VEGF quanto HGF, sendo as hAFSCs-VEGF tão intensas quanto as ESC (Figura 26).

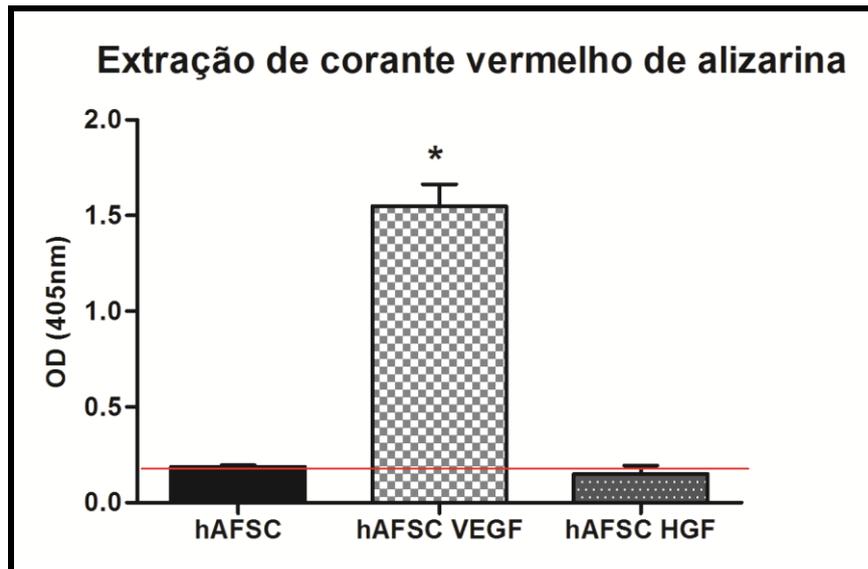


Figura 25. Extração de corante vermelho de alizarina nas amostras das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com VEGF e HGF, induzidas à diferenciação osteogênica.

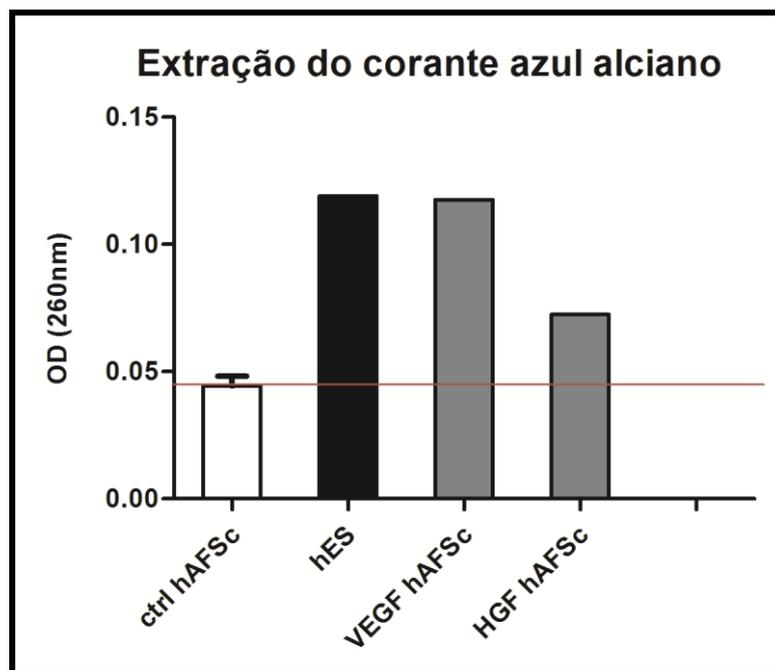


Figura 26. Extração de corante azul alciano nas amostras das células mesenquimais estromais do líquido amniótico humano transduzidas com VEGF e HGF e nas células tronco embrionárias, induzidas à diferenciação condrogênica.

3. CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Lesão renal aguda

A lesão renal aguda (LRA) é uma síndrome em que ocorre o rápido declínio da filtração glomerular caracterizada pelo aumento da creatinina sérica, inabilidade de manutenção ou regulação de fluídos, eletrólitos e do equilíbrio ácido-base. A LRA pode ser tanto causada ou induzida por uma toxinas, como por isquemia. Essa lesão pode ser reversível, no entanto frequentemente leva à falência sistêmica de órgãos (MORIGI et al., 2004; TÖGEL et al., 2005) e à fibrose intersticial (HUNPHREYS & BONVENTRE, 2008). A incidência de insuficiência renal em estágio final está aumentando em todo o mundo (PORT et al., 2000). Dessa forma, necessita-se de uma nova estratégia terapêutica para um tratamento mais efetivo com o intuito de evitar a fibrose e o desenvolvimento de insuficiência renal crônica.

O tratamento clínico da lesão renal aguda tem melhorado significativamente nos últimos anos, mas não existe ainda uma terapia específica efetiva, a qual permaneça a função das células epiteliais tubulares (BONVENTRE, 2003) e não forme fibrose túbulo intersticial, evitando a doença renal crônica (BUSSOLATI et al., 2009). Apesar do entendimento sofisticado da epidemiologia e patologia da LRA, estratégias preventivas atuais são inadequadas e as opções de tratamento, além da terapia de reposição renal, são inexistentes (WAIKAR ET AL., 2008).

O rim é um órgão altamente complexo, composto por cerca de 24 tipos celulares em diferentes compartimentos (BUSSOLATI et al., 2009), sendo que o dano a qualquer um dos componentes do néfron (glomérulo, túbulo, interstício e vasos sanguíneos) pode resultar em uma perda irreversível de função, levando à fibrose (MORIGI et al., 2004; TÖGEL et al., 2005).

Imediatamente após a lesão, os miofibroblastos e as células lesadas produzem metaloproteinases de matriz, os quais rompem a membrana basal e secretam diferentes fatores, os quais recrutam leucócitos que migram através da membrana basal rompida. Os leucócitos secretam TGF- β , Il-4 e Il10. A inflamação possui um papel importante na patofisiologia da lesão renal aguda e na progressão da fibrose intersticial e atrofia tubular renal progressiva. Em casos de depleção de macrófagos há atenuação tanto da inflamação

quanto da fibrose e diminuição de TGF- β (KO et al., 2008).

Os linfócitos T são importantes tanto na doença imunomediada quanto na isquemia renal, sendo relevante a inibição dessas células pela MSC para seu efeito terapêutico na IRA (FRIEDEWALD & RABB, 2004). As MSC são imunologicamente privilegiadas e mesmo quando alógenas não induzem resposta de proliferação de linfócitos T. O mecanismo dessa tolerância inclui baixa expressão de moléculas de superfície de ambos complexos maior de histocompatibilidade (MHC). A supressão da proliferação de linfócitos T pela MSC não causa nenhuma restrição imunológica e o efeito supressor foi similar tanto em células autólogas quanto alógenas (LE BLANC et al., 2003; KRAMPERA et al., 2003).

Atualmente, as MSCs têm demonstrado alguma propriedade imunomodulatória, sendo capazes de suprimir a ativação e a proliferação de linfócitos T, assim como células apresentadoras de antígeno, natural killers e linfócitos B. Provavelmente a administração de MSC pode agir como moduladora da resposta inflamatória após um evento de isquemia e reperfusão (I/R) renal (RASMUSSEN, 2006; NAUTA, 2007; STAGG, 2007)

Isquemia e reperfusão

A LRA severa piora o prognóstico de pacientes hospitalizados, sendo a sua causa mais freqüente a isquemia transitória ou hipoperfusão renal prolongada, a qual afeta principalmente a função e estrutura de células epiteliais tubulares, que, em casos graves, é caracterizada por necrose das células epiteliais. A lesão de isquemia e reperfusão renal resulta de um déficit na oxigenação e distribuição de nutrientes e remoção de metabólitos das células renais, podendo tanto ser local quanto generalizado (LE DORZE et al., 2009).

A isquemia não exclusivamente leva a alterações das células epiteliais, mas também provoca inflamação intersticial e microvasculopatia intersticial. Tanto a inflamação e microvasculopatia são particularmente importantes em termos de reparação renal pós-isquêmica. A microvasculopatia pós-isquêmica é caracterizado por edema das células endoteliais levando subsequentemente à oclusão microvascular, em um fenômeno de não-refluxo, o qual inibe a reperfusão (PATSHAN et al., 2012).

A I/R renal é caracterizada por alterações no metabolismo celular, inflamação, geração de radicais livres e apoptose que resulta em desprendimento das células tubulares renais originárias da membrana basal sendo liberado na urina (LIN et al., 2003). A lesão por I/R ocorre não somente pela perda de regulação sanguínea, mas também pela produção e

regulação de eventos multifatoriais, tais como o rompimento do citoesqueleto de actina devido às alterações de metabolismo do nucleotídeo adenina e no cálcio intracelular, perda de adesão celular entre célula e matriz extracelular, geração de moléculas reativas de oxigênio e resposta inflamatória determinada pela ativação do endotélio, o qual leva ao recrutamento e infiltração de células efetoras (SÁENZ-MORALES et al., 2006; BOROS & BROMBERG, 2006; THURMAN, 2007; PATSCHAN et al., 2012). Diversas citocinas pró-inflamatórias e imunomodulatórias são secretadas no tecido renal e na circulação, tais como Il- 1, -6 e -8, TGF- β , TNF- α e MCP-1 (RAMESH & REEVES, 2004). A presença de infiltrado intersticial inflamatório é uma característica marcante da fase pós-isquêmica. Esse infiltrado intersticial é composto principalmente de macrófagos, neutrófilos, células NK e linfócitos T, os quais fazem a modulação da resposta inflamatória (BONVENTRE & WEINBERG, 2003; ZHANG et al., 2008).

Com a lesão severa, as células perdem sua superfície de polaridade de membrana levando à morte por necrose ou apoptose e desprendem-se (BONVENTRE, 2003; DEVARAJAN, 2006; SÁENZ-MORALES et al., 2006), sendo a membrana basal a única barreira entre o filtrado glomerular e o interstício peritubular. O aumento da permeabilidade resulta em extravasamento desse filtrado no interstício. As células e os seus fragmentos que se destacaram da membrana basal combinam-se com outras proteínas presentes no lúmen para formar cilindros que obstruem os túbulos e aumentam a pressão intratubular (BUSH et al., 2000), impedindo a filtração glomerular.

Modelo de Isquemia e Reperfusão

O modelo I/R renal é um modelo já bem descrito, o qual é realizado pela colocação de um clampe ao redor de ambas artérias renais ou ambos pedículos renais. Outro fator importante é a grande variação de tempo de isquemia descrito na literatura, sendo relatado o tempo de oclusão entre 25 a 90 minutos em ratos e de 15 a 45 minutos em camundongos. PARK et al. (2008) relataram a ocorrência de lesão mediana quando a isquemia foi realizada por 25 minutos levando ao aumento da creatinina em até duas vezes o valor basal. Quando o tempo de isquemia aumentou para 45 minutos, a lesão renal foi intensa, com necrose de mais de 75% dos túbulos renais e elevação da creatinina em 7 vezes o valor basal.

Há evidências de que as fêmeas humanas e murinas apresentam nefroproteção após insulto isquêmico renal (MÜLLER et al., 2002; HUTCHENS et al., 2008). Os ratos, quando

castrados, apresentaram mesmo efeito nefroprotetor do que as fêmeas (MÜLLER et al., 2002), levando a acreditar que essa proteção esteja associada aos hormônios androgênicos, os quais possivelmente mediam alterações endotélio vasculares.

Progressão da doença renal crônica

A patogênese da progressão da doença renal (PDR) é de grande complexidade, porém é válido ressaltar que independentemente da etiologia da doença original, a PDR é resultado de um processo patogênico que conduz a uma via final comum, na qual a glomerulosclerose e a fibrose intersticial aparentemente têm papéis fundamentais. Além de um ponto não totalmente definido, citado por alguns como perda de 75% da taxa de filtração glomerular, não há retorno da função renal e a progressão para DRC terminal é inevitável, não podendo ser interrompida por tratamento e nem mesmo pela remissão da doença original.

Acredita-se que a lesão primária glomerular leva a redução do fluxo pós-glomerular, o que culmina com perda da capilaridade peritubular (FINE et al., 1998). Isso cria uma ambiente de hipoxia que produz uma resposta de fibrose, a qual subsequentemente propaga a lesão por afetar capilares adjacentes antes saudáveis. Uma outra perspectiva é de que a lesão renal desencadeia uma resposta inflamatória, que recruta citocinas profibróticas, tais como o TGF- β (YOSHIOKA et al., 1993), induzindo a transformação de células renais epiteliais e endoteliais em miofibroblastos, em um processo denominado de transdiferenciação epitélio-mesenquimal (TEM), além de estimular a produção de proteínas da matriz extracelular e inibir a sua degradação. (LIU, 2010; WANG et al., 2011) Actina de músculo liso- α (α -SMA) é uma proteína característica de células musculares lisas, tais como o miofibroblasto, e sua alta expressão no rim tem sugerido sinais de TEM (JIANG et al., 2009). Os fibroblastos e os miofibroblastos levam ao aumento da matriz intersticial e subsequentemente à lesão tubulointersticial e atrofia (ASKENAZI et al., 2006). A principal característica da DRC é a fibrose tubulointersticial, sendo então a fibrose um dos melhores preditores de progressão ao estágio final da doença renal (SINHA, et al., 2009).

Além do processo pró-fibrótico, a hipóxia também inibe a degradação da matriz extracelular por meio de redução da expressão e atividade de metaloproteinases de matriz, tais como metaloproteinase-I de colágeno (FINE et al., 2008). A fibrose em si não é suficiente para impedir a função do rim. A perda eventual da microvasculatura cria um ambiente hipóxico levando à progressão da fibrose. A rarefação de capilares peritubulares foi observada em exame de biópsias de pacientes com DRC (BOHLE et al., 1996) e em modelos animais (KANG et al., 2002).

Regeneração renal

Evidências sugerem que o rim contém um sistema renopoiético e que o polo urinário da cápsula de Bowman pode representar um nicho de células tronco, o qual é um local específico no tecido adulto, onde as células-tronco residem (RIZVI & WONG, 2005; BLANPAIN et al., 2007).

O rim é um órgão terminalmente diferenciado com um potencial significativamente menor de proliferação em comparação com outros órgãos do corpo, tais como o fígado. Além disso, seu potencial de regeneração celular não é suficiente para a regeneração de todo o órgão, pois o rim possui diferentes tipos celulares funcionais ao invés de apenas um tipo celular. De fato, a regeneração renal requer a reposição de tipos celulares específicos, adjacentes uns aos outros de uma adequada forma espacial (IWATANI & IMAI, 2010). Sendo assim, a ocorrência de regeneração natural do rim continua a ser um processo intrigante. Tem sido demonstrado que a regeneração renal durante a renovação do tecido normal e, especialmente após lesão renal, pode ser mediada por meio de substituição por células maduras não proliferativas, que reentram no ciclo celular, ao invés das células-tronco (PLENICEAU et al., 2010). Uma população auto-renovadora de células progenitoras do rim embrionário foi isolada e comprovou-se o seu amplo potencial de diferenciação mesodérmica. Esta população possivelmente representa o mesênquima metanéfrico (MM) não comprometido, o qual apresenta potencial mesenquimal e estromal, no entanto não parece persistir ao fim da nefrogênese. Esta população de células embrionárias renais nunca foi isolada a partir de rim adulto, confirmando que enquanto o MM embrionário representa uma população de células-tronco multipotentes, este não persiste após o nascimento (LUSIS et al., 2010).

Estudos histológicos revelam que a perda de células durante a lesão renal aguda é seguida pela desdiferenciação fenotípica de células tubulares sobreviventes na região da lesão (BONVENTRE, 2003). Estas células rapidamente reexpressam marcadores típicos de néfron em desenvolvimento, tais como a molécula de adesão celular neural (NCAM) e Pax-2 (ABBATE et al., 1999; VILLANUEVA et al., 2006). Estudos de vários grupos de pesquisa demonstram que estas células tubulares parcialmente dediferenciadas proliferam após uma lesão e, assim, repovoam o túbulo renal (WITZGALL et al., 1994; LIN et al., 2005). MAESHIMA et al. (2003) injetaram BrdU em ratos durante 7 dias para marcar as células em divisão durante esse tempo e, em seguida, submeteram ratos a lesão de isquemia e reperfusão renal, sendo então observado que as células tubulares que haviam retido o BrdU eram as

células do túbulo proximal e ducto coletor e eram estas células as mais prováveis de se desdiferenciar (expressam vimentina) e proliferar em resposta à lesão.

Lesão renal e tratamento com células-tronco

Vários grupos demonstraram a utilização de diferentes tipos de CTAs no tratamento de LRA em diferentes modelos animais experimentais (Tabela 4), obtendo resultados benéficos. Tem sido demonstrado que as MSCs podem melhorar a recuperação tanto da LRA citotóxica (HERRERA et al., 2004; MORIGI et al., 2008) quanto isquêmica (DUFFIELD et al., 2005; TOGEL et al., 2005). Em um estudo realizado por KUNTER e colaboradores (2007) 2×10^6 MSC foram injetados na artéria renal e obtiveram benefício, no entanto aos 60 dias, 20% do glomérulo continham grandes adipócitos provenientes de uma má diferenciação das MSCs. Uma explicação para essas alterações é o número de células injetadas, uma vez que em outros estudos foram injetados $2-10 \times 10^5$, o que poderá ter resultado em uma alta concentração local celular, predispondo a algumas vias de diferenciação das MSCs.

Em um modelo de necrose tubular por glicerol, as AFSC foram capazes de sobreviver, reproduzir-se e integrar-se no rim *in vivo*, demonstrando que essas células sobreviveram por até um mês após o transplante (PERIN et al., 2007). Além disso, hAFSCs GFP positivas incorporam em estruturas renais primordiais e expressaram os marcadores precoces renais ZO-1, fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial (GDNF) e claudina contribuindo assim para o desenvolvimento de vesículas renais, em forma de corpos C- e S (PERIN et al., 2007). Da SACCO (2010) identificou as AFSCs expressando marcadores de células progenitoras renais, incluindo precursores dos podócitos e epiteliais tubulares e células mesangiais.

Nefroproteção mediada por fatores de crescimento

Em um estudo recente observou-se que o meio de cultivo das MSC foi suficiente para se conseguir o mesmo benefício com o transplante das MSCs (BI et al., 2007), provavelmente devido à presença dos fatores solúveis e microvesículas secretados pelas MSCs, tendo um efeito parácrino nas células renais residentes.

As MSCs secretam inúmeras citocinas e fatores de crescimento, incluindo fator estimulador de colônia granulocítica, fator de células tronco, IL-6, IL-11 (HAYNESWORTH et al., 1996), VEGF, HGF, IGF. Alguns desses fatores solúveis aumentam a proliferação

epitelial, modulam a inflamação e promovem a angiogênese, sendo, portanto bons candidatos para eficácia terapêutica em lesões renais. O IGF-1 e o HGF, por exemplo, são morfogênicos e mitogênicos epiteliais que também promovem o aumento do fluxo sanguíneo renal e são conhecidos por proteção da lesão isquêmica (HIRSCHBERG & ADLER, 1998; LIU, 2002).

Uma das citocinas mais importantes para a regeneração renal é a VEGF (MA et al., 2011). Devido à sua ação angiogênica e nefroprotetora, que funciona em conjunto com outros fatores de crescimento para promover a divisão celular, a migração, a sobrevivência da célula endoteliais, e a neovascularização. O transplante de hMSC transduzida com VEGF levou a benefícios ainda maiores de proteção contra o lesão renal aguda, aumentando os efeitos antiapoptóticos e melhorando a microcirculação e proliferação celulares (YUAN et al., 2011).

Estudos recentes sugerem que o HGF é uma potente proteína nefrotrópica que desempenha um papel crítico na promoção da reparação tubular e regeneração renal após estímulos nocivos (KAWAIDA et al., 1994; MILLER et al., 1994; NIGAM & LIEBERTHAL, 2000; VARGAS et al, 2000), além de ser um potente fator protetor das células epiteliais tubulares renais, evitando a apoptose (KUAN, 2008; VIJAYAN et al., 2001). Além do efeito protetor ou regenerativo do HGF em células epiteliais tubulares, esta proteína tem sido relatada por possuir adicionalmente um efeito antifibrótico (YANG et al, 2001;. MIZUI et al, 2004), pela diminuição da expressão de colágeno IV, um dos maiores componentes da matriz extracelular no glomérulo e TGF- β 1, e aumento da expressão de MMP-2, a qual degrada o colágeno (ESPOSITO et al., 2005). A administração de HGF recombinante em ratos com lesão renal aguda isquêmica aumenta a recuperação funcional e morfológica do epitélio tubular lesionado (MILLER et al., 1994). Foi comprovado que o bloqueio da HGF endógena aumenta a progressão da lesão crônica, bem como a sua suplementação exógena diminui a progressão (GONG et al., 2006). A administração de HGF em ratos imediatamente após a lesão renal resultou em aumento da proliferação tubular e recuperação da função (MILLER et al., 1994).

A introdução desses fatores nefroprotetores nas CTs por meio de manipulação genética, poderia proporcionar novos caminhos para uma nova terapia farmacológica para a lesão renal aguda, visto que a regulação e manipulação da função parácrina apresentam um novo método para melhorar a eficácia das MSCs (YUAN et al., 2011).

Tabela 4. Estudos já realizados relacionados a lesão renal e tratados com terapia celular.

Artigo	Modelo	Espécie	Via	Fonte	Janela terapêutica	Resultado
LIN et al., 2003	I/R 15 min	Camundongo	IV –V.cauda	2,0x10 ⁵ BMSC	2 e 4h	Nefroproteção
LANGE et al., 2005	I/R 40 min	Rato	IA-A.Aorta	1,5x10 ⁶ BMSC	Após refluxo	Nefroproteção
LIN ET AL., 2005	I/R 45 min	Camundongo	IV –V.cauda	1,0x10 ⁶ BMSC	2h	
TOGEL et al., 2005.	I/R 40 min	Rato	IA-A.Carótida	1,0x10 ⁶ BMSC	Após refluxo e 24h	Nefroproteção ↓ Apoptose e ↑ mitose
BEHR et al., 2006	I/R unilateral 60 min	Ovelha	IA -A. renal	8x10 ⁷ BMSC autólogo	1h e 2s	Admisnitração após 1h > índice de enxerto
DA SILVA et al., 2007	I/R 30 e 45 min	Camundongo	IV –V.cauda	1,0x10 ⁷ BMSC		Sem efeito
LI et al., 2007	I/R 45 min	Camundongo	IV –V.cauda	1,0x10 ⁶ BMSC	2h	Nefroproteção
SEMEDO et al., 2007	I/R 60 min	Rato	IV	BMSC	6h	↓ Inflamação Nefroproteção
TOGEL et al., 2007	I/R 30 min	Camundongo	IA	1,0x10 ⁵ BMSC ou EC-MSC	Após refluxo	↓ Apoptose
TOGEL et al., 2008.	I/R 30 min	Camundongo	IA-A. Aorta IV Jugular	1,0x10 ⁵ BMSC	Após refluxo	IA melhor resultado Nefroproteção
CHEN et al., 2008	I/R 30 min	Camundongo	IV –V.cauda	1,0x10 ⁶ MSC renal	24h	↑ Angiogênese Nefroproteção
BEHR et al., 2009.	I/R 60 min	Ovelha	IA -A. renal	5x10 ⁷ BMSC	Após refluxo	Sem efeito
KUDRYAVTSEV et al., 2009	Uninefrectomia + I/R 90min	Rato	Córtex renal	hBMSC fetal	Após refluxo	Nefroproteção
TOGEL et al., 2009.	IR 58 min	Rato	IA -A.aorta	1,5x10 ⁶ BMSC	Após refluxo	↓TGF e fibrose
WANG et al., 2009.	I/R 60 min	Rato	IV IP IC	4,0x10 ⁶ NSC	4h	Nefroproteção IV melhor resultado ↓inflamação
CAO et al., 2010	I/R 60 min	Rato	IA-A. carótida	1,0x10 ⁶ UC-MSC	16h	Nefroproteção
FENG et al., 2010.	I/R 38 min	Rato	IA	5x10 ⁶ ADSC	Após refluxo	↑ Mitose e sobrevida ↓inflamação
GATTI et al., 2011	Uninefrectomia + I/R 45 min	Rato	IV –V.cauda	30µg Microvesículas de hBMSC	Após refluxo	Nefroproteção
ZHUO et al., 2011	I/R 60 min	Rato	IV	1,0x10 ⁶ BMSC alógeno	Após refluxo	Nefroproteção
ASANUMA et al., 2010	Obstrução ureteral	Rato		1,0x10 ⁶ hBMSC	1 e 4 sem	Nefroproteção
PERIN et al., 2010	Glicerol	Camundongo	Córtex renal	1,0x10 ⁶ hAFSC e AFSC alógeno	2h	↓ Apoptose ↑ Mitose
BI et al., 2007	Cisplatina	Camundongo	IV –V.cauda IP	1,0x10 ⁵ ADSC ou 2,0x10 ⁵ BMSC	72h	↓ Apoptose
MORIGI et al., 2008	Cisplatina	Camundongo	IV –V.cauda	5,0x10 ⁵ hBMSC	24h	Nefroproteção
YUAN et al., 2011	Cisplatina	Camundongo	IV	ESC-VEGF ou ESC 5x10 ⁵	24h	↓ Apoptose e ↑ Mitose grupo ESC VEGF
KUNTER et al., 2007	Uninefrectomia + Anti-Thy	Rato	IA	2,0x10 ⁶ BMSC	48h	Nefroproteção a curto prazo, após mal diferenciação em adipócitos
SEMEDO et al., 2009	Nefrectomia5/6	Rato	IV	2,0x10 ⁵ BMSC	q14d/8sem	↓ Fibrose
LEE et al., 2010	Nefrectomia5/6	Rato	IV –V.cauda	BMSC	q 7d	Tratamento semanal, melhor efeito

Vias de administração

O cirurgião tem como principal objetivo facilitar o tráfego, a adesão e a infiltração das MSCs, mas também proporcionar às MSCs o microambiente especializado ou nicho para auxiliar a sua auto-renovação e manter sua multipotencialidade (CAPELA et al., 2003). Atualmente, tem sido discutido que apesar do potencial das células-tronco, a via de administração apropriada para o transplante celular em um órgão lesionado é um pré-requisito essencial para o sucesso do seu enxerto com intuito de reparação de órgãos.

As principais vias de administração das CT tendo o rim como órgão alvo são: via intraperitoneal (IP), intravenosa (IV), intra-arterial (IA) e a injeção local no rim ou sob a capsula renal (Tabela 4). Quando a via de administração utilizada é a IV, geralmente as células são injetadas na veia da cauda ou na veia jugular; quando usada a via de administração IA, injeta-se nas artérias carótida, renal e aorta torácica e abdominal na região suprarrenal.

A infusão sistêmica das MSCs, tanto pela via IV como pela IA, distribui as células homogêneas no rim (LEE et al., 2008; SACKSTEIN et al, 2008). Apesar da infusão por via IV ser a menos invasiva, o transplante das células-tronco por via IA tem maiores índices de enxertia (BARBASH et al, 2003;. FREYMAN et al., 2006; ZONTA et al., 2010). Isso provavelmente se deve pelo fato de que o seu trajeto inicial evita passar pelos órgãos de filtração, tais como os pulmões e o baço, as MSCs chegam mais facilmente ao órgão alvo. Além disso, a administração pela via IA tem apresentado nefroproteção mais significativa (TOGEL et al., 2008). Por estes motivos, o transplante de MSC por via IA é mais comumente utilizado em diversos estudos pré-clínicos (BEHR et al, 2007;. WALCZAK et al, 2008).

***Homing* e tráfico das células estromais mesenquimais**

O *homing* das MSCs é definido como a chegada e permanência dessas células dentro da vasculatura de um tecido ou órgão alvo, seguida por transmigração através do endotélio. Após a infusão, as MSCs permanecem na circulação por não mais do que uma hora (GAO et al., 2001). Posteriormente, as MSCs são detectáveis principalmente nos pulmões, baço, e em terceiro lugar nos órgãos lesados, embora neste último em baixa frequência. É importante determinar a posição exata das MSCs dentro dos tecidos em relação aos vasos sanguíneos, principalmente depois de 24h de seu transplante, pois as células podem estar temporariamente dentro dos vasos no tecido, passivamente aprisionadas na vasculatura ou extravasaram através da parede vascular, enxertando no tecido (SACKSTEIN et al., 2008; WALCZAK et al., 2008).

Enxertia das MSCs

Ainda é altamente controverso que as MSC realizam enxertamento no néfron, e mesmo os pesquisadores que aceitam essa hipótese, acreditam que essa taxa de integração das MSC é muito baixa, sendo observado apenas em 8% das células regeneradas (LIN et al., 2003). Se as MSC não repovoam diretamente nos locais lesados no rim, reparando os túbulos renais, então mecanismos parácrinos e endócrinos, com influencia mitogênica, antiapoptótica, antiinflamatória e angiogênica, poderiam explicar seu efeito terapêutico em casos de lesão renal.

Tanto o transplante de um maior número de CT quanto o seu transplante antecipado após evento isquêmico tem demonstrado uma melhora na taxa de enxertia (CHEN et al., 2001). Porém, as poucas MSCs que enxertam podem contribuir para a reparação dos tecidos pela secreção de moléculas tróficas que incluem matriz extracelular solúvel, citocinas e fatores de crescimento (ANKRUM & KARP, 2010) e pela conexão direta entre célula-célula (MSCs e células teciduais adjacentes (PLOTNIKOV et al., 2008).

Em ratos recém-nascidos as AFSC alógenas foram capazes de enxertar em diferentes tecidos, mesmo na ausência de lesão em qualquer órgão (GHIONZOLI et al., 2010). O intestino foi o órgão em que se observou maior positividade (67%), seguido pelo fígado (25%), baço (16%), coração (16%), pulmões (16%), fêmur (8%) e cérebro (0%), sendo que a presença das células foi comprovada tanto por análise de imunohistoquímica como por PCR (GHIONZOLI et al., 2010).

Anatomia cirúrgica renal

Os rins são órgãos pares que lembram a forma de um grão de feijão e localizam-se no espaço retroperitoneal, lateral à aorta e à veia cava caudal. Eles têm uma cápsula fibrosa e são mantidos em sua posição pelo tecido conjuntivo subperitoneal. Na parte medial côncava de cada rim, localiza-se o hilo renal, local onde se encontram a artéria e a veia renal, vasos linfáticos, plexos nervosos e o ureter, que se expande dentro do seio renal, formando a pelve. O rim é irrigado pela artéria renal, a qual se origina da artéria aorta. A veia renal drena o rim e desemboca na veia cava inferior.

O rim é envolvido em toda sua superfície por membrana fibroelástica muito fina e brilhante, denominada cápsula renal. Esta adere à pelve e aos vasos sanguíneos na região do hilo. O rim direito é envolvido pela gordura perirrenal e relaciona-se ventralmente com parte do intestino delgado e o esquerdo, com o estômago, parte do omento, baço e pâncreas. Em relação à topografia dos rins no rato, o direito é mais cranial do que o esquerdo, assim como os seus vasos do pedículo (TAGUCHI et al., 2001).

Devido à sua localização, o rim está situado dorsalmente às estruturas e órgãos abdominais, sendo necessárias algumas manobras atraumáticas para a sua exposição, por exemplo: o duodeno descendente e cólon descendente podem ser tracionados inferior e medialmente para melhor visualização do rim direito e esquerdo, respectivamente. Os rins são órgãos pares que lembram a forma de um grão de feijão e localizam-se no espaço retroperitoneal, lateral à aorta e à veia cava caudal. Eles têm uma cápsula fibrosa e são mantidos em sua posição pelo tecido conjuntivo subperitoneal. Na parte medial côncava de cada rim, localiza-se o hilo renal, local onde se encontram a artéria e a veia renal, vasos linfáticos, plexos nervosos e o ureter, que se expande dentro do seio renal, formando a pelve. O rim é irrigado pela artéria renal, a qual se origina da artéria aorta. A veia renal drena o rim e desemboca na veia cava inferior.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Modelo de isquemia e reperfusão renal

Essa fase experimental foi importante para a otimização e estabelecimento de modelo cirúrgico de isquemia e reperfusão. Nessa fase testaram-se dois tempos de isquemia: 45 e 50 minutos e duas marcas de clampes atraumáticos vasculares buldogue, os quais foram denominados clampe 1³⁰ e 2³¹. Foram utilizados 12 ratos, três em cada protocolo cirúrgico: 45 minutos com o clampe 1, 50 min com o clampe 1, 45 min com o clampe 2 e 50 min com o clampe 2.

A indução e a manutenção anestésica foi realizada em câmara de isoflurano vaporizado a 100% de O₂. Realizou-se a antisepsia em solução alcoólica de clorexidine 0,2%, seguida de paramentação do campo cirúrgico.

Para o acesso da cavidade abdominal realizou-se uma celiotomia mediana pré-retro-umbilical e em seguida os órgãos abdominais foram envolvidos em gaze umedecida com solução salina morna. Para acesso ao rim direito, tracionava-se o cólon ascendente para o esquerdo e com o auxílio de uma pinça, na parede abdominal do lado oposto, o rim era exposto para a sua manipulação. Para acesso ao rim esquerdo, tracionava-se o cólon descendente para o lado direito. Dissecava-se o hilo renal para a colocação do clampe atraumático vascular buldogue, seguido do seu posicionamento ao redor do pedículo renal por 45 ou 50 minutos, dependendo do grupo. Após a colocação do clampe, observou-se alteração da coloração renal (Figura 27). A reperfusão renal foi confirmada visualmente após a remoção dos clampes.

Os animais foram mantidos aquecidos em colchão térmico até a completa recuperação anestésica e receberam como analgesia pós-operatória buprenorfina na dose de 0,1mg/kg a cada 12 horas por dois dias.

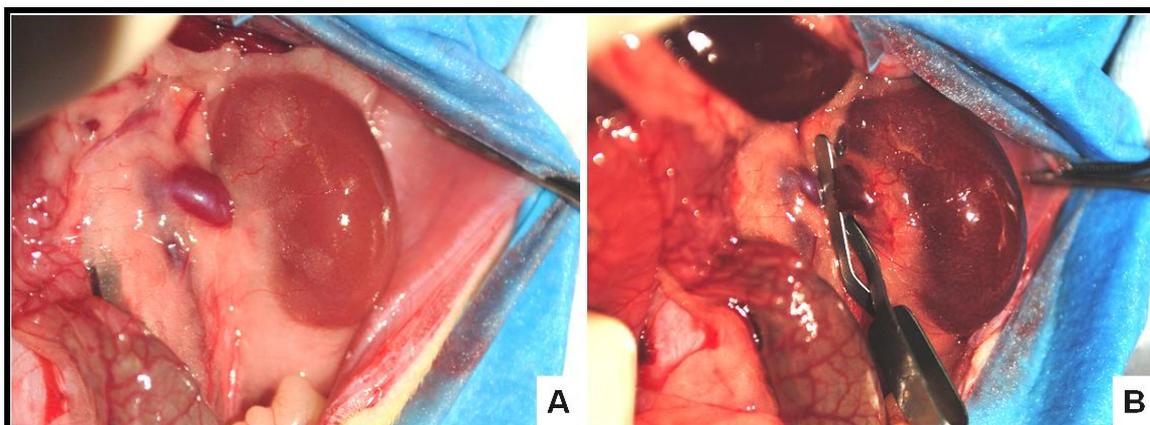


Figura 27. Aspecto do rim após colocação do clampe vascular atraumático buldogue no pedículo renal. Observar a coloração vermelho-acastanhada antes da colocação do clampe (A) e a evidência de isquemia o seu escurecimento após a colocação do clampe (B).

³⁰ Fine science tools

³¹ Edlo

Todos os procedimentos envolvendo animais seguiram as normas do comitê de ética e experimentação animal da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram mantidos em gaiolas forradas com maravalha, em ambiente com temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade controlada, com ciclo claro/escuro de 12 x 12 horas e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

2. Técnica cirúrgica de acesso ao rim para transplante celular

Para a otimização da técnica cirúrgica, injetou-se tinta nanquim na aorta abdominal com o intuito de observar o trajeto do líquido injetado, testando-se duas diferentes técnicas.

Os ratos foram induzidos e paramentados da mesma forma como anteriormente. Para o acesso da cavidade abdominal realizou-se celiotomia mediana pré-retro-umbilical e em seguida os órgãos abdominais foram envolvidos em gaze umedecida com solução salina morna. A aorta abdominal foi dissecada caudalmente à artéria renal (Figura 28A). Após um fio mononáilon4-0³² foi utilizado para realizar o reparo da aorta (Figura 28B). A fim de direcionar o fluxo das células injetadas para a artéria renal, ocluiu-se a aorta com um clampe buldogue aproximadamente 1 cm caudal aos pedículos renais, logo acima das artérias genitais (Figura 28C). No grupo A (n = 2), 0,8ml de nanquim foi injetado, sem a oclusão de qualquer pedículo renal e no grupo B (n = 2), o pedículo renal direito foi ocluído (Figura 28D) antes da administração de 0,4 ml de tinta nanquim, em seguida, o mesmo clampe foi reposicionado no pedículo renal esquerdo e administrado mais 0,4ml de tinta nanquim. A manobra para o acesso aos pedículos renais foi a mesma utilizada anteriormente. Uma cateterização retrógrada foi realizada utilizando-se cateter 26G³³ diretamente na aorta abdominal em ângulo de 45° , logo acima do clampe posicionado na aorta anteriormente (Figuras 29 e 30). Após a administração, o cateter foi removido e a hemostasia foi realizada por compressão manual do local de punção com uma membrana absorvível de colágeno³⁴ previamente umedecida com solução salina, por cerca de 5 minutos.

Os animais foram submetidos à eutanásia por exanguinação imediatamente após a administração de nanquim pela aorta e os rins foram colhidos e armazenados em solução de formol a 4%. Após 24h nessa solução, os rins foram processados para parafinização, seccionados em $4\mu\text{m}$ e corados em Hematoxilina & Eosina.

³² Ethicon

³³ Neoflon 26 g 0,6 X 19 mm -BD

³⁴ Lyostypt® - B. Braum

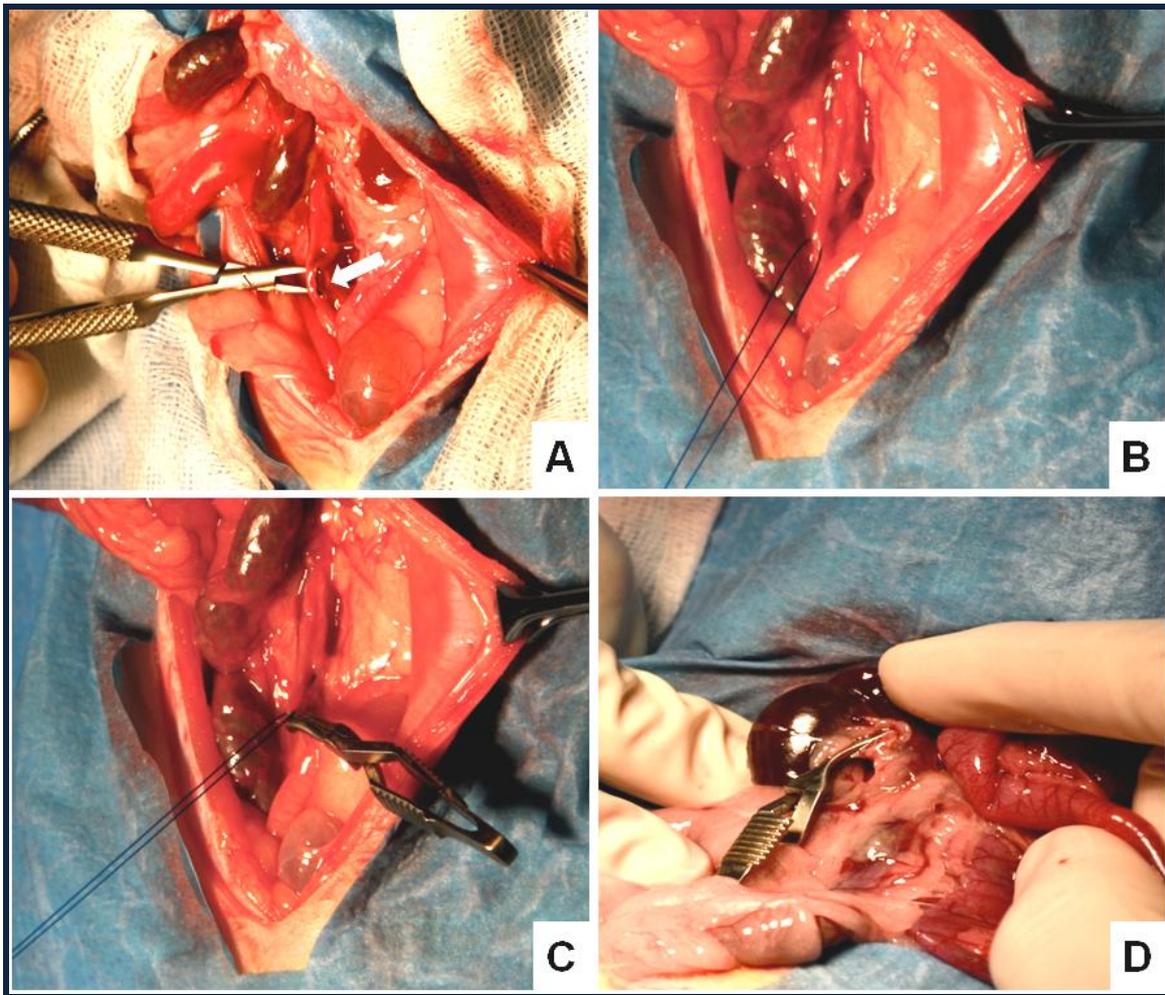


Figura 28. Passos para o acesso à artéria renal. Dissecção da aorta abdominal caudalmente à artéria renal, indicada pela seta branca (A), colocação de reparo ao redor da aorta abdominal (B), posicionamento do clampe vascular buldogue cerca de 1 cm caudal aos pedículos renais, logo acima das artérias genitais (C) e colocação do clampe no pedículo renal direito, etapa necessária apenas no grupo B.

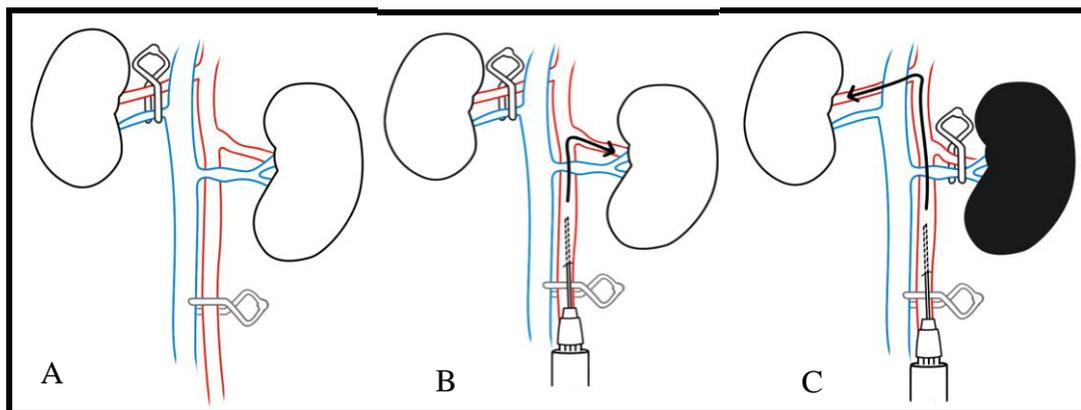


Figura 29. Esquema da cirurgia de acesso à artéria renal realizado no grupo B. Colocação dos clampes na artéria aorta abdominal, caudalmente às artérias renais e no pedículo renal direito (A); localização da inserção do cateter 26G ligeiramente cranial ao clampe buldogue para administração de metade da tinta naquim (B) e transferência do clampe do pedículo direito para o esquerdo com o intuito de permitir a administração da outra metade da tinta naquim.

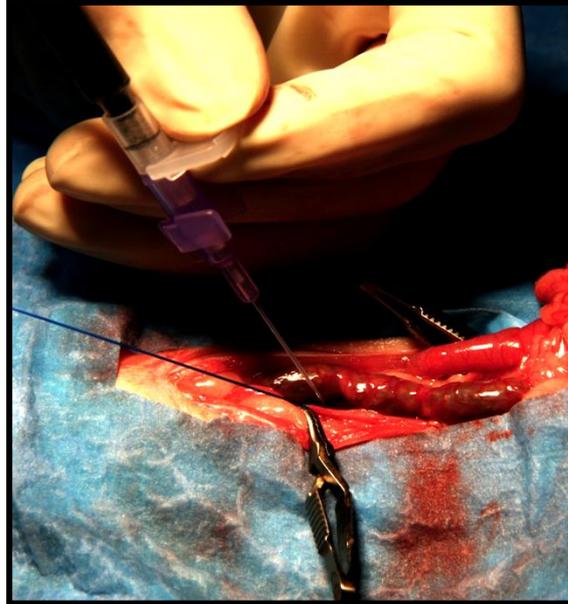


Figura 30. Ângulo de inserção do cateter na aorta abdominal para acesso da artéria renal.

3. Transplante de hAFSC transduzida com Lac-Z

Com o intuito de localizar o posicionamento das AFSCs e sua distribuição após 24h de sua administração, injetou-se AFSCs marcadas com LAC-z, um gene repórter, na aorta abdominal após 6 horas da indução da isquemia e reperfusão renal. A técnica do grupo B, descrita anteriormente, foi utilizada nesse caso. A eutanásia foi realizada 24 horas após o transplante celular com inalação de isoflurano, no interior de um recipiente, seguindo a legislação em vigor e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os rins, pulmões, coração, baço e fígado foram colhidos e colocados em um molde com meio OCT, próprio para congelamento, para posterior análise. Realizaram-se criosecções de 5 μm de espessura, posteriormente incubadas em solução X-gal pH 8,0, durante a noite, em câmara escura. As lâminas foram contracoradas com paracarmina e montadas em meio Mowiol.

4. Indução da lesão e transplante celular

Grupos animais

Foram usados 50 ratos machos da raça Wistar, 3 meses de idade, pesando entre 250-300 g, distribuídos nos seguintes grupos após lesão de isquemia e reperfusão (n=10): Controle, tratado apenas com o meio Chang; grupo AFSC, tratado com AFSCs (1×10^6); grupo AFSC-VEGF, tratado com AFSCs transduzida com VEGF (1×10^6); grupo AFSC-HGF, tratado com AFSCs transduzida com HGF (1×10^6); grupo AFSC-VEGF+HGF, tratado com AFSCs transduzida com VEGF ($0,5 \times 10^6$) e transduzida com HGF ($0,5 \times 10^6$). No grupo sham (n = 4) os animais foram operados,

sem lesão de isquemia/reperfusão e sem tratamento.

Os ratos foram induzidos em câmara de isoflurano vaporizados com 100% de O₂ e mantidos com esse mesmo gás anestésico em máscara durante todo o procedimento cirúrgico. Realizou-se a antisepsia em solução alcoólica de clorexidine 0,2%, seguido de paramentação do campo cirúrgico. A lesão por isquemia e reperfusão foi induzida da mesma forma como descrita anteriormente, ou seja, pelo clampeamento do pedículo renal por 50 minutos. A reperfusão do rim foi confirmada visualmente após os clampes serem removidos. Seis horas após a lesão isquêmica, realizou-se o transplante celular na aorta abdominal em dois tempos, como descrito anteriormente. Administraram-se 800 µl da suspensão celular (1,0x10⁶ celular) em meio Chang nos grupos tratados, ou seja, 400 µl em cada rim e nos animais do grupo controle administrou-se o mesmo meio Chang, pela mesma via e mesma forma.

Colheita de material

Após 24 horas de tratamento 0,5 ml de sangue foi colhido da veia da cauda. Os ratos foram submetidos à eutanásia por meio de exsanguinação em ratos anestesiados em câmara de isoflurano após 48 horas (n = 5 ratos para cada grupo) e após 2 meses do tratamento (n = 5 ratos para cada grupo). Em ratos anestesiados com isoflurano, colheram-se de 10-15 ml de sangue da aorta abdominal para a quantificação de VEGF sérica e creatinina. Cada rim foi pesado e depois seccionado longitudinalmente, sendo metade fixada em 10% de formol tamponado neutro para exame histológico e imuno-histoquímica, e a outra metade foi congelada e armazenada em nitrogênio líquido para análise de RT-PCR.

5. Análises do efeito da terapia celular

Função Renal

A creatinina sérica foi mensurada para avaliar a função renal nos tempos 24 horas, 48 horas e dois meses após a reperfusão. A mensuração foi realizada em um leitor de ELISA, usando-se a técnica de Jaffé, como descrita anteriormente.

Quantificação de VEGF sérico

Quantificou-se VEGF sérico em todos os ratos 24h após o transplante celular. Para isso, 10 µl de soro de cada animal foram diluídos em 90 µl de tampão carbonato e adicionados a um poço de uma placa de 96 poços e realizou-se a técnica de ELISA, como descrito no capítulo 1.

Análise histológica da lesão de isquemia e reperfusão em 48 horas

Morfologia renal: Amostras fixadas em formol forma parafinizadas e depois seccionadas com espessura de 4 μm . Após serem desparafinizadas, foram coradas com os reagentes Hematoxilina & Eosina e ácido periódico de Schiff (PAS). As laminas foram avaliadas e classificadas quanto a: formação de cilindros hialinos, necrose tubular, mitose, dilatação tubular e presença de infiltrado intersticial mononuclear. Observaram-se campos não-sobrepostos em alta magnificação utilizando uma objetiva de 40X. A classificação variou de 0 a 5, sendo 0 quando não havia lesão; +1 quando observava-se lesão em padrão isolado; +2 quando observava-se menos de 25% de lesão por campo; +3 quando observava-se lesão entre 25 e 50% do campo; +4 quando observava-se lesão entre 50 e 75% do campo e +5 quando mais de 75% do campo. As laminas foram avaliadas por um observador independente, de maneira cega.

Imuno-histoquímica: Com o intuito de analisar o índice de mitose, a presença de miofibroblastos e a expressão de TGF- β , realizou-se a análise de imuno-histoquímica para KI-67, α -SMA e TGF- β , respectivamente. A imunocoloração foi realizada em secções parafinizadas de 4 μm . Em resumo, realizou-se a desparafinização, seguido de bloqueio da peroxidase endógena com 0,5% H_2O_2 diluída em metanol durante 30 min à temperatura ambiente. A recuperação do antígeno foi realizada em tampão citrato (10 mmol / L, pH 6,0) por duas horas a 95°C. Em seguida o bloqueio antigênico foi realizado por meio da incubação das secções com 1% BSA e 2% leite em PBS + 1% Tween 80 durante 60 min. As lâminas foram incubadas durante a noite a 4 ° C com os seguintes anticorpos policlonais diluídos em PBS: actina de músculo liso- α (α -SMA³⁵) em diluição 1/200, Ki-67³⁶ em diluição 1/50 e Fator de crescimento transformador- β (TGF- β ³⁷) em diluição 1/150. Utilizaram-se como controle negativo amostras sem a incubação com anticorpo primário. A marcação específica foi detectada com o anticorpo secundário conjugado ao HRP³⁸, de acordo com o anticorpo primário A reação de cor foi revelada com 3,3 '-diaminobenzidina³⁹ (DAB) e contracorada com Hematoxilina de Mayer. Os cortes foram gradualmente desidratados em etanol e xilol e as lâminas montadas em DEPEX. Realizaram-se três lavagens das lâminas com PBS por 5 min entre todos os passos do procedimento, exceto após o bloqueio antigênico. Todas as lâminas foram avaliadas por um patologista experiente de maneira cega para identificação da amostra. As células Ki-67-positivas eram detectadas pela marcação intranuclear das células dentro da túbulos em magnificação de 400x e o TGF- β e α -SMA foram observados em magnificação de 200X (n = 5

³⁵ α -SMA, clone 1A4, Dako, Belgium.

³⁶ Ki-67 clone MIB -5, Dako, Belgium.

³⁷ ab66043 TGF- β , Abcam, Belgium.

³⁸ Envision™ WAS / HRP Detection Kit, Dako, Belgium.

³⁹ 3,3 '-diaminobenzidina –Sigma, Barnem, Belgium.

ratos para cada grupo).

Análise morfológica para índice mitogênico: Foram analisadas 29 lâminas obtidas através da técnica imuno-histoquímica. Em cada lâmina foram capturados doze (12) campos, não coincidentes com um aumento aproximado de 400X. Em cada campo microscópico foi efetuada a quantificação de células Ki-67 positivas, determinada pela coloração acastanhada, sem levar em consideração a intensidade da coloração.

Para a análise morfológica, utilizou-se a ferramenta de medição do Sistema de Processamento e Análise de Imagens IMAGE TOOL® - versão 3.0.

Análise histológica da lesão de isquemia e reperfusão dois meses após a cirurgia

Morfologia Renal: Amostras fixadas em formol foram parafinizadas e depois seccionadas com espessura de 4 µm. Após serem desparafinizadas, foram coradas com os reagentes Hematoxilina & Eosina, Tricômico de Masson e Picrosirius Red, sendo que os dois últimos coram colágeno de azul e de vermelho, respectivamente. A análise das lâminas coradas com Hematoxilina & Eosina, quantificou dilatação tubular; presença de cilindros hialinos, infiltrado mononuclear intersticial, proliferação fibrosa interna e subcapsular; espessamento da cápsula glomerular e atrofia glomerular. Observaram-se campos não-sobrepostos em alta magnificação utilizando uma objetiva de 40X. A classificação variou de 0 a 5, sendo 0 quando não havia lesão; +1 quando observava-se lesão em padrão isolado; +2 quando observava-se menos de 25% de lesão por campo; +3 quando observava-se lesão entre 25 e 50% do campo; +4 quando observava-se lesão entre 50 e 75% do campo e +5 quando mais de 75% do campo. Nas lâminas coradas pelo Tricômico de Masson, observou-se principalmente a presença de fibrose e os resultados foram avaliados por morfometria. Para a análise das secções coradas por Tricômico de Masson, utilizou-se uma objetiva de 20X e para a análise das secções coradas por Picrosirius Red, utilizou-se uma objetiva de 10X, sob luz polarizada.

Morfometria para a fibrose renal: Foram analisadas 29 lâminas obtidas através da coloração Tricômico de Masson. Em cada lâmina foram capturados vinte (20) campos, não coincidentes com um aumento aproximado de 200X. Em cada campo microscópico foi mensurada a área de fibrose, determinada pela coloração azul, sem levar em consideração a intensidade da coloração.

Para a análise morfológica, utilizou-se a ferramenta Colour Deconvolution do Sistema de

Formação de tumor

Visto que o VEGF é conhecido por ser um potente indutor da angiogênese, especialmente relacionado com a angiogênese tumoral, avaliou-se a formação de tumor durante a colheita de amostras dois meses após o transplante celular. A mensuração de VEGF sérico foi também realizada pelo método ELISA, uma vez que níveis elevados de VEGF sérico podem indicar a presença de um tumor secretor de VEGF.

6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Os dados foram analisados pelo método não paramétrico Kruskal-wallis, seguido do teste de Dunn ou Anova, seguido de Tukey. Considerou-se o nível de significância estatística de $p < 0,05$. Para a sobrevida, realizou-se o teste Kaplan Meir.

RESULTADOS

1. Modelo de isquemia e reperfusão renal

O modelo de lesão foi mais eficiente utilizando o clampe 2, por 50 minutos. Utilizando o clampe 1 observou-se ligeiro aumento da creatinina, no entanto, houve aumento mediano da creatinina (cerca de duas vezes o valor basal). Em relação ao tempo de isquemia, com a permanência do clampe por 45 minutos houve aumento da creatinina, mas por 50 minutos esse aumento era mais significativo, permanecendo a sobrevivência dos animais inalterada.

2. Técnica cirúrgica de acesso ao rim

Inicialmente realizou-se a inserção do cateter por via normógrada, no entanto, pelo fato da vasculatura da região a ser dissecada ser mais envolta de tecido conjuntivo e de acesso mais difícil e pelo fato de a ponta do cateter ficar além do ramo das artérias renais, optou-se por modificar a inserção para o modo retrógrado. Outra intercorrência cirúrgica observada foi a hemorragia da aorta no ponto puncionado, sendo possível após a hemostasia por compressão com uma membrana absorvível de colágeno.

Quando a administração do nanquim foi realizada em um só tempo, sem a colocação do clampe nas artérias renais, observou-se a coloração preta da tinta nanquim apenas no rim direito (Figuras 31 e 32). Dessa forma, conclui-se que a administração da tinta nanquim em duas etapas e a colocação do clampe na artéria renal eram fundamentais para a administração homogênea em ambos rins.



Figura 31. Aspecto dos rins direito (preto) e esquerdo vermelho-acastanhado), imediatamente após a administração de nanquim em um tempo.

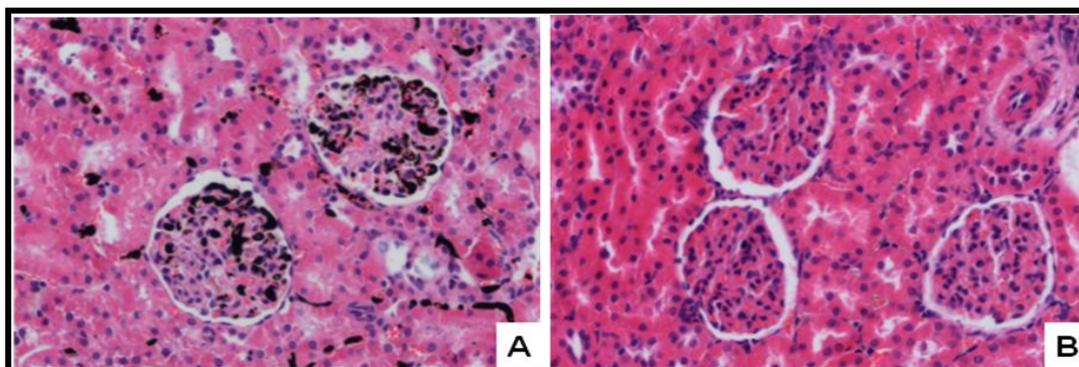


Figura 32. Rim direito (A) e esquerdo (B) corados por Hematoxilina & Eosina no grupo em que se administrou nanquim (A) em apenas um tempo e sem a colocação de clampe na artéria renal (Magnificação100x).

3. Transplante de AFSC transduzida com Lac-Z

Com o intuito de avaliar onde as AFSC injetadas realizariam enxertia, amostras de rim, coração, pulmão, fígado e baço foram coradas com solução X-gal para a detecção de células marcadas com β -galactosidade. Observou-se a presença de células marcadas apenas em amostras do pulmão e do baço (Figura 33), sendo que algumas vezes elas eram presentes em grandes concentrações.

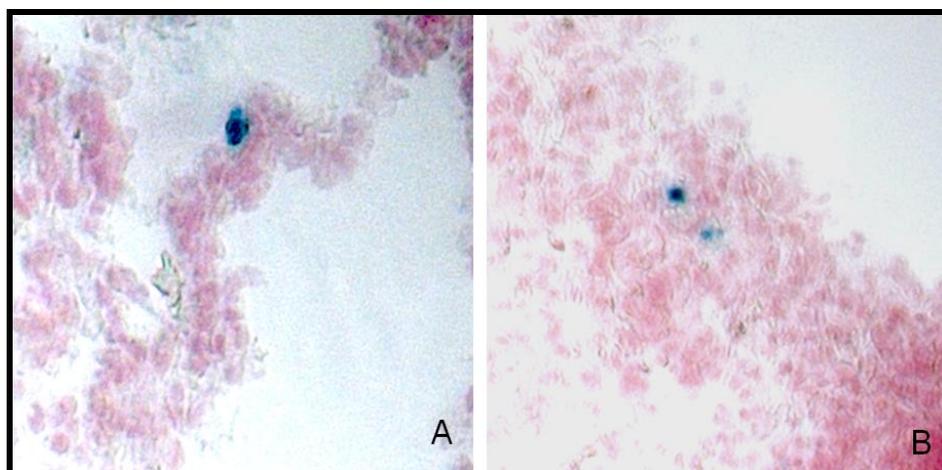


Figura 33. Amostras de criosecção coradas com solução X-gal. Baço (A) e pulmão (B) de rato, 24h após a administração de hAFSC marcada com Lac-z (magnificação 200x).

4. Efeito do terapia com células transduzidas ou não com VEGF e HGF em lesão de isquemia e reperfusão renal

Risco de embolismo

Três animais do grupo hAFSC HGF morreram imediatamente após o transplante celular. Não foi observado esse efeito de morte súbita em nenhum outro animal de outros grupos. Não foi

realizada a necropsia desses animais.

Sobrevida

Avaliou-se a sobrevida dos diferentes grupos avaliados por dois meses, sendo observada alta mortalidade no grupo hAFSC-HGF (3/8 ratos), sendo que dois deles morreram 5 dias e um aos 6 dias após a indução da I/R (Figura 34) Apenas um rato do grupo controle morreu aos 7 dias após a indução da I/R.

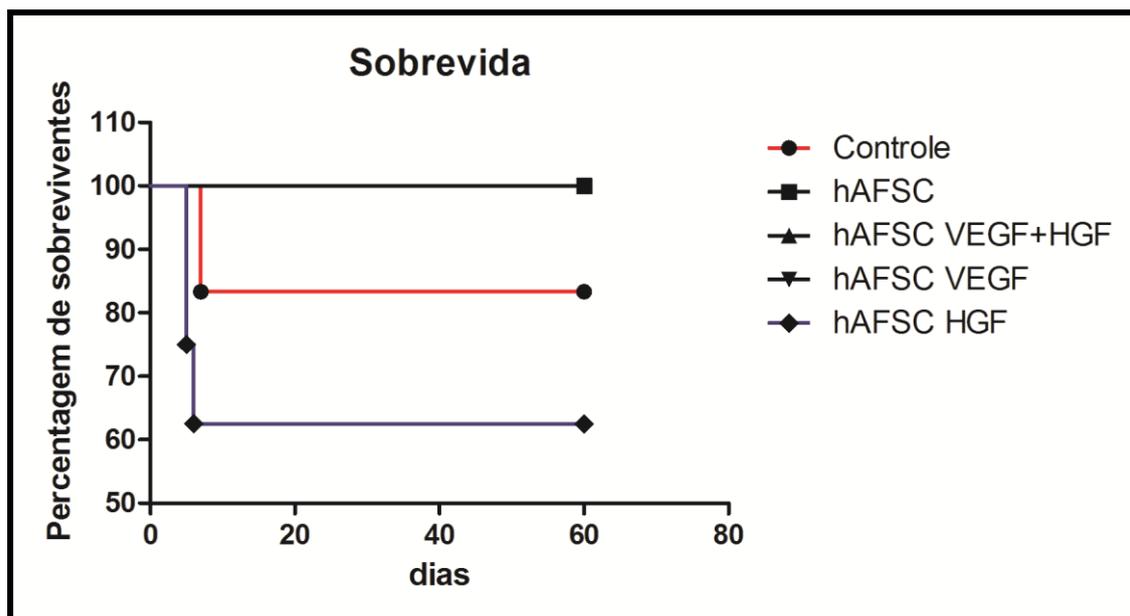


Figura 34. Curva de sobrevida dos animais dos diferentes grupos de ratos com lesão de isquemia e reperfusão tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano transduzida ou não com VEGF e HGF.

Função Renal

A função renal foi avaliada por meio da quantificação da creatinina nos diferentes grupos. Quanto se comparou a creatinina sérica de um animal *sham* (saudável), observou-se aumento muito significativo da creatinina no grupo controle, no entanto essa diferença foi mais significativa ainda nos grupos AFSC VEGF e AFSC HGF, tanto em 24h quanto em 48h. Já o grupo AFSC apresentou aumento significativo somente em 48h (Tabela 5).

Tabela 5. Valores séricos de creatinina em ratos com lesão de isquemia e reperfusão, nos tempos 24 h, 48 h e dois meses, tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano transduzidos ou não com VEGF e HGF.

Grupo	Creatinina 24h (n=10)	Creatinina 48h (n=10)	Creatinina 2m (n=5)
<i>Sham</i> ou saudáveis	0,58±0,07	0,6±0,03	0,61±0,04
Controle	3,05±1,28**	2,45±1,93**	0,74±0,15
hAFSC	1,98±1,08	2,06±1,29*	0,75±0,18
hAFSC VEGF+HGF	1,96±0,55	1,28±0,35	0,8±0,21
hAFSC VEGF	3,9±2,03***	4,29±3,32***	0,62±0,05
hAFSC HGF	4,0±1,85***	4,1±3,0***	0,63±0,13

* p entre 0,05 e 0,01 ** p entre 0,01 e 0,001 ***p<0,001

VEGF sérico em 24 horas

Quantificou-se o VEGF sérico em 24 horas em todos os grupos (n=10), sendo observada uma elevação em todos os grupos tratados com terapia celular em relação ao grupo controle, no entanto essa diferença não foi significativa entre os grupos (Figura 35).

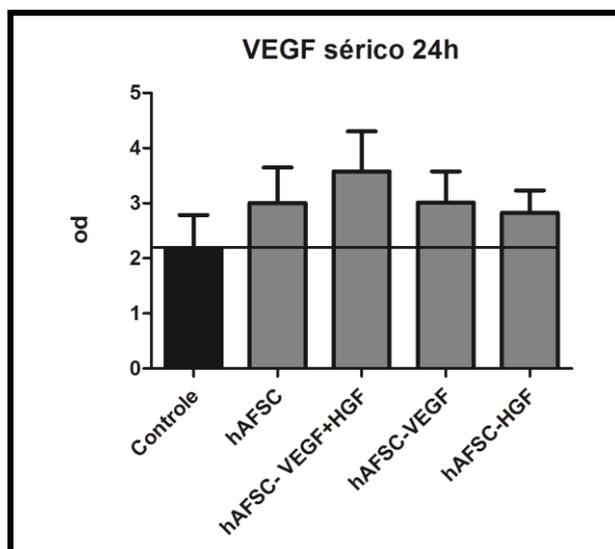


Figura 35. Gráficos com valores de VEGF sérico de ratos com lesão de isquemia e reperfusão após 24 h do tratamento com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano transduzidos ou não com VEGF e HGF.

Peso renal

Houve uma fraca tendência de redução do peso renal em todos os grupos aos dois meses, no entanto essa diferença não foi significativa (Tabela 6).

Tabela 6: Peso dos rins de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão e tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC) transduzidas ou não com VEGF e HGF. Valores expressos em gramas (g), com respectivas médias e desvio padrão. Kruskal wallis seguido de pós teste de Dunn.

Grupos	Peso em 48h após I/R (g)	Peso 2 meses após I/R (g)
Controle		
Rim direito	1,86±0,1	1,83±0,06
Rim esquerdo	2,00±0,2	1,77±0,13
hAFSC		
Rim direito	1,93±0,01	1,79±0,21
Rim esquerdo	1,86±0,08	1,72±0,22
hAFSC VEGF +HGF		
Rim direito	1,99±0,26	1,85±0,17
Rim esquerdo	1,95±0,23	1,8±0,16
hAFSC VEGF		
Rim direito	1,72±0,23	1,8±0,16
Rim esquerdo	1,65±0,18	1,86±0,24
hAFSC HGF		
Rim direito	1,89±0,17	1,84±0,21
Rim esquerdo	1,92±0,22	1,88±0,27

Morfologia renal 48 horas

Observou-se necrose e formação de cilindros hialinos em graus variados nos diferentes grupos, sendo estes observados tanto na coloração de H&E quanto na coloração PAS. A quantificação desses dados por um patologista em ensaio cego nos permitiu comparar os tratamentos quanto à lesão tubular aguda (Tabela 7), sendo observadas lesões mais intensas nos grupos controles, hAFSC VEGF e hAFSC HGF (Figuras 36 e 37). Além disso, observou-se intensa atividade mitótica e a presença de infiltrado mononuclear intersticial nos diferentes grupos. Houve correlação do grau de lesão tubular aguda com o aumento da creatinina (ANEXO 1).

Tabela 7. Média e desvio padrão dos escores de lesão tubular aguda em cortes histológicos de ratos corados por Hematoxilina & Eosina nos diferentes grupos após 48 horas de lesão renal isquêmica tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC) transduzidas ou não com VEGF e HGF. * AFSC difere do controle ($p < 0,05$).

Grupo	Necrose tubular	Cilindros hialinos
Controle	2,7±0,97	4,4±0,65
hAFSC	1,8±0,76	1,9±0,96*
hAFSC VEGF +HGF	1,8±1,09	2,8±1,09
hAFSC VEGF	2,9±1,08	3,6±1,08
hAFSC HGF	2,7±1,2	3,9±0,96

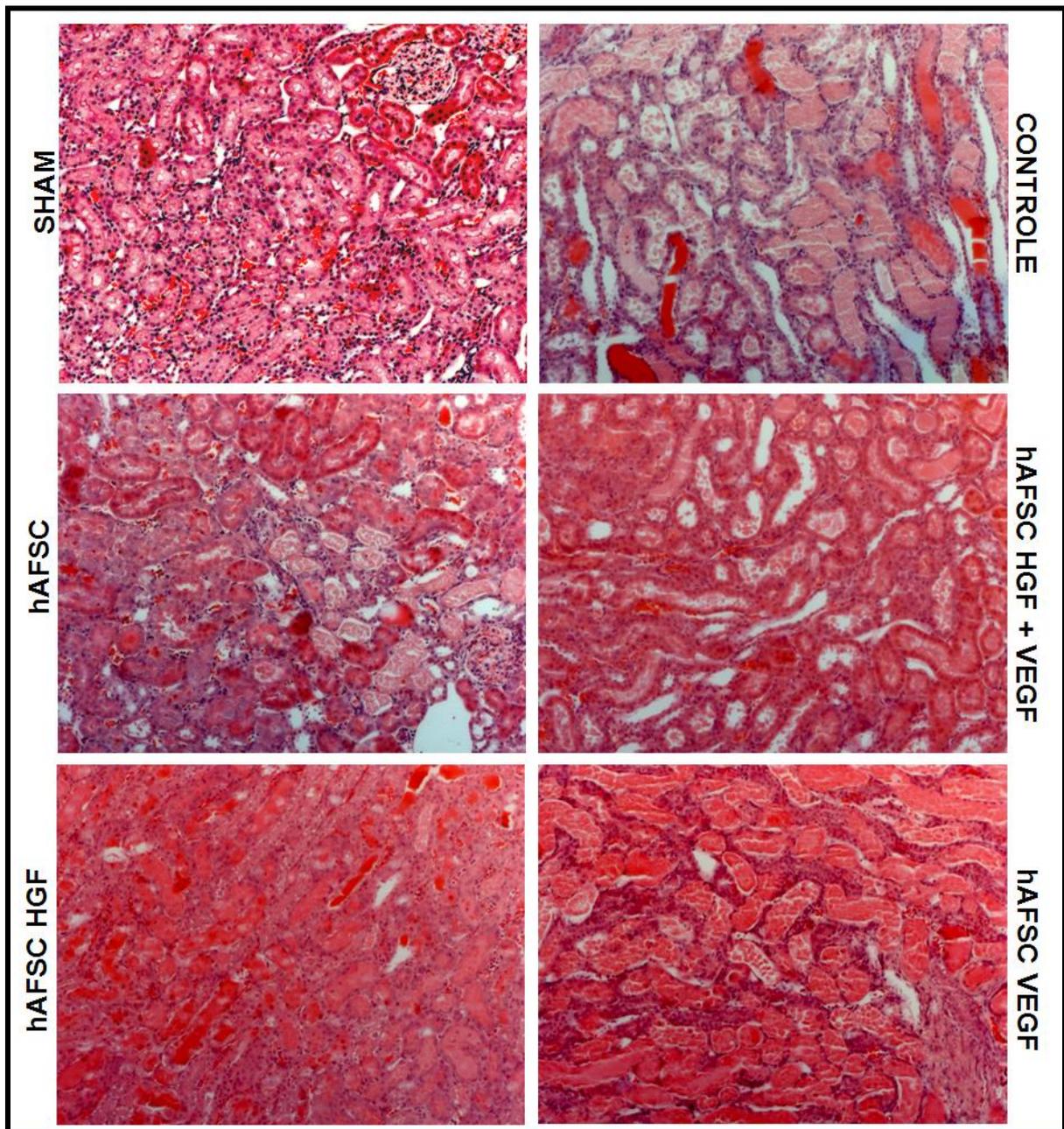


Figura 36. Fotos representativas da histologia renal 48 horas após indução de isquemia e reperfusão por 50 minutos em ratos. Cortes histológicos corados por H & E, objetiva de 10X: sham (ratos operados, sem indução de lesão e sem tratamento; controle, ratos com I/R tratados com meio de cultivo; hAFSC, ratos com I/R tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humanas (hAFSC); hAFSC VEGF + HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e HGF; hAFSC VEGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e hAFSC HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com HGF (n=5 por grupo).

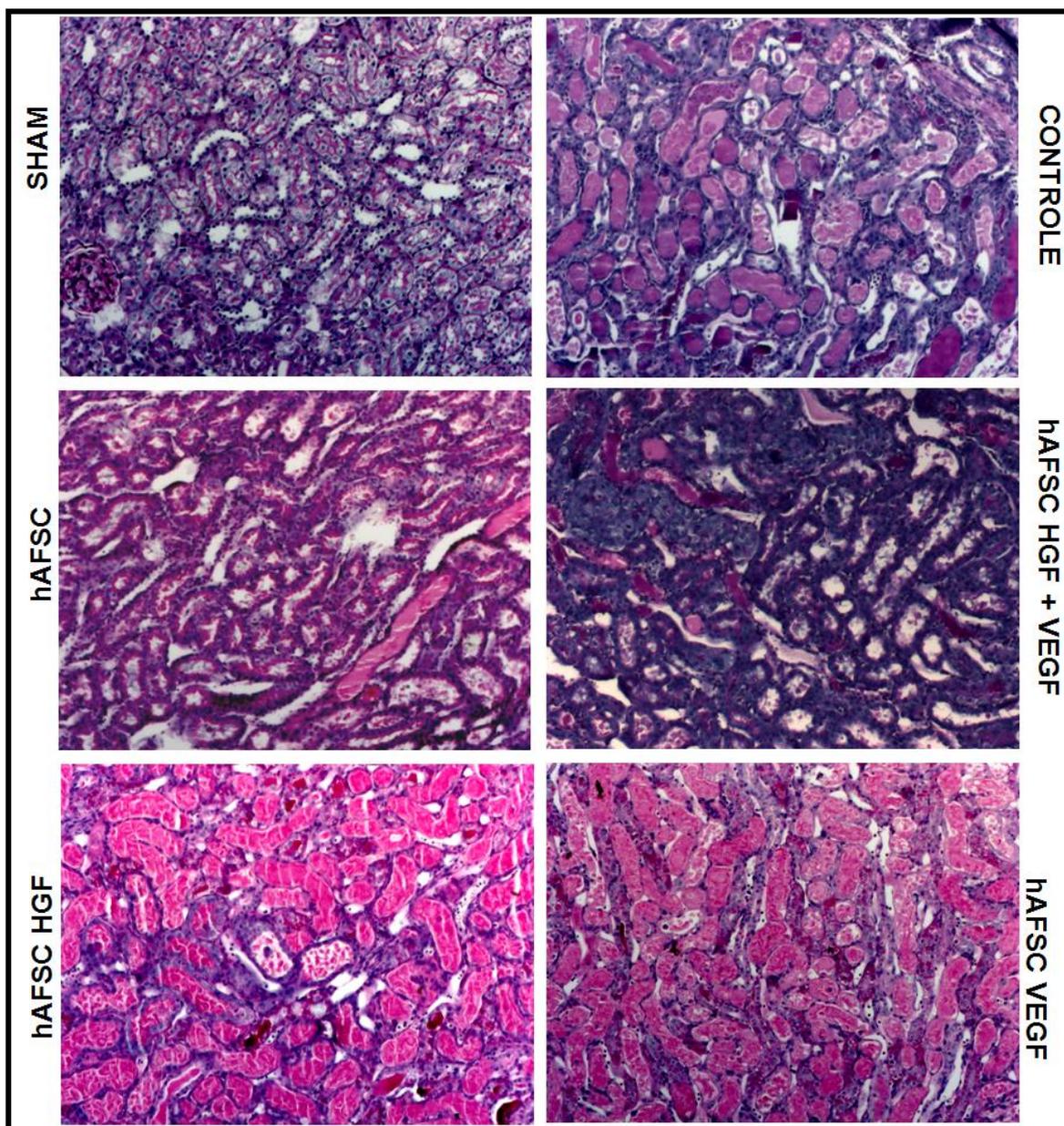


Figura 37. Fotos representativas da histologia renal 48 horas após indução de isquemia e reperfusão por 50 minutos em ratos. Cortes histológicos corados por ácido periódico de Schiff (PAS), objetiva de 10X: sham (ratos operados, sem indução de lesão e sem tratamento; controle, ratos com I/R tratados com meio de cultivo; hAFSC, ratos com I/R tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humanas (hAFSC); hAFSC VEGF + HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e HGF; hAFSC VEGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e hAFSC HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com HGF(n=5 por grupo).

Imuno-histoquímica para α -SMA e TGF- β

Quanto à análise imuno-histoquímica para α -SMA, que cora vasos sanguíneos e miofibroblastos, classificou-se como marcação fraca e forte, desconsiderando-se os vasos sanguíneos. Observou-se intensa positividade em 4/5 ratos do grupo hAFSC VEGF, 2/5 ratos do grupo controle e apenas 1/5 do grupo hAFSC VEGF + HGF (Figura 38). Para as lâminas coradas contra o TGF- β , foi observada intensa positividade em todos os ratos do grupo controle, em 4/5 do grupo hAFSC VEGF e fracamente positivos em 2/5 do restante do grupo (Figura 39).

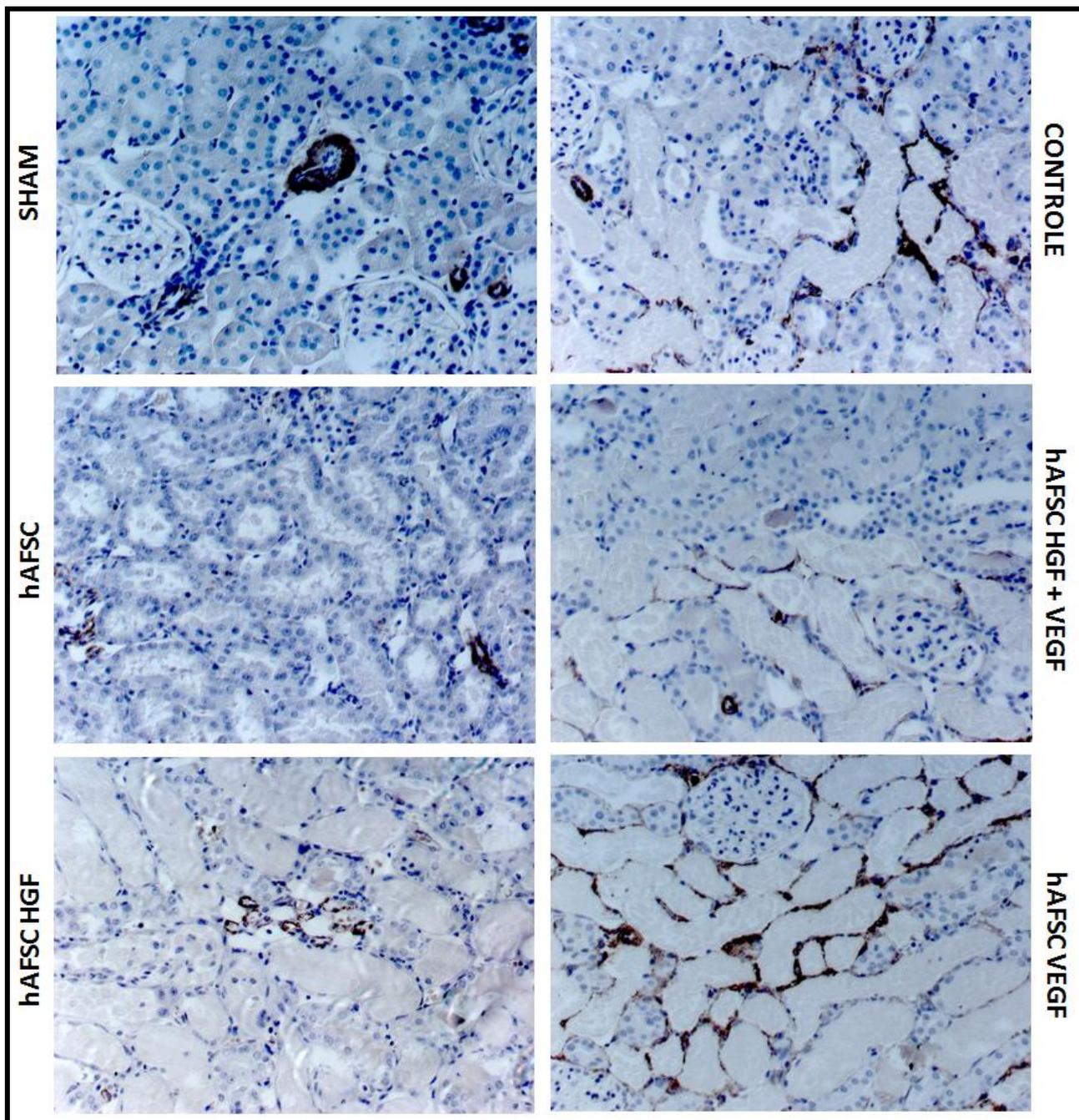


Figura 38. Fotos representativas de cortes histológicos de rins de ratos após indução de lesão de isquemia e reperfusão por 50 minutos corados pela técnica de imuno-histoquímica para α -SMA sendo observada a positividade em marrom e utilizando-se objetiva de 20X: sham (ratos operados, sem indução de lesão e sem tratamento; controle, ratos com I/R tratados com meio de cultivo; hAFSC, ratos com I/R tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humanas (hAFSC); hAFSC VEGF + HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e HGF; hAFSC VEGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e hAFSC HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com HGF (n=5 por grupo).

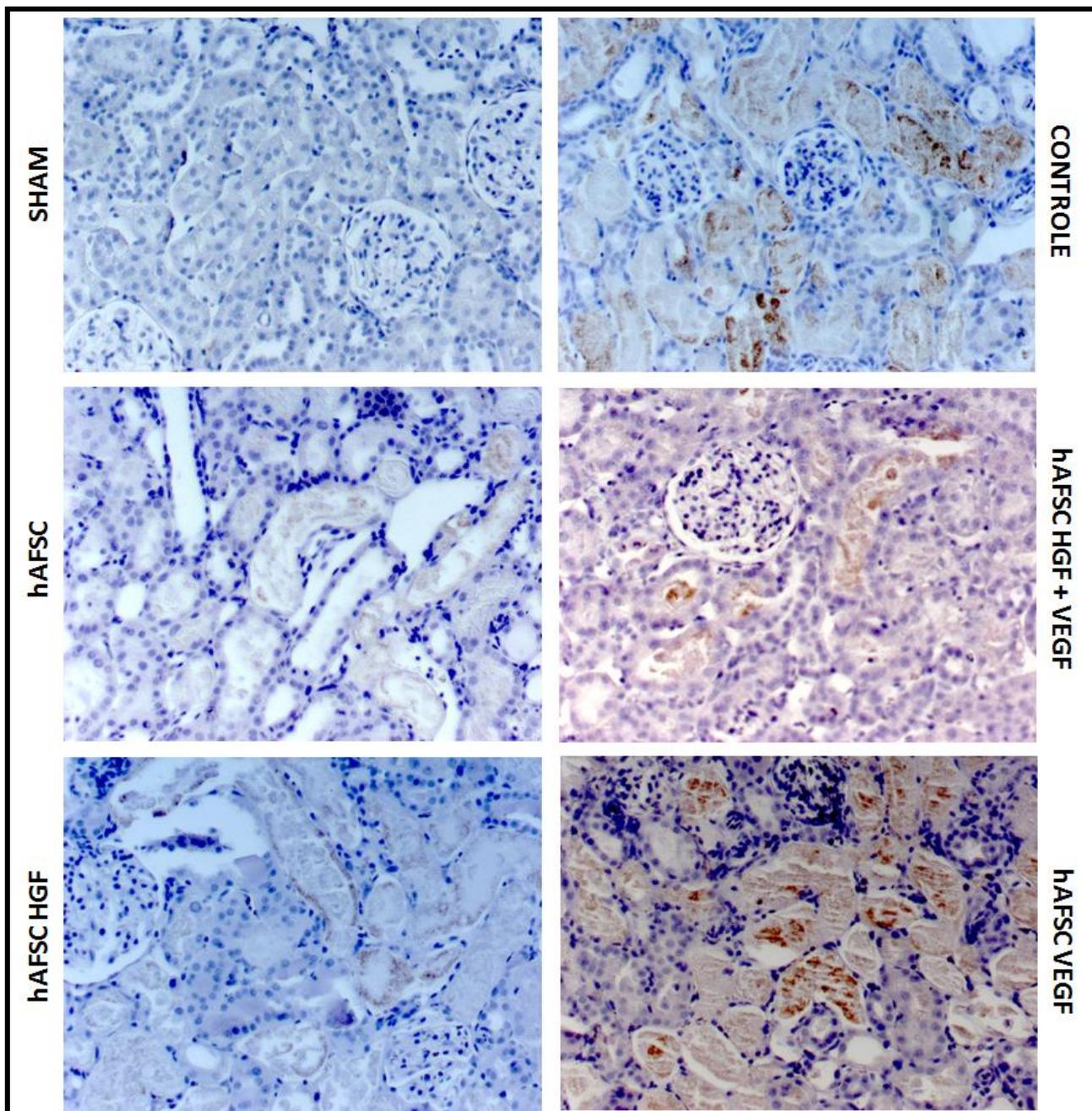


Figura 39. Fotos representativas de cortes histológicos de rins de ratos após indução de lesão de isquemia e reperfusão por 50 minutos corados pela técnica de imuno-histoquímica para TGF- β , sendo observada a positividade em marrom utilizando objetiva de 20X: sham (ratos operados, sem indução de lesão e sem tratamento; controle, ratos com I/R tratados com meio de cultivo; hAFSC, ratos com I/R tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC); hAFSC VEGF + HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e HGF; hAFSC VEGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e hAFSC HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com HGF (n=5 por grupo).

Morfometria para Ki-67

Observou-se a intensa presença de células mitóticas nos túbulos renais, indicada pela marcação intranuclear (Figura 40). Esses núcleos foram quantificados em doze campos de grande aumento, sendo observada a presença mais significativa ($p < 0,001$) nos grupos AFSC CEGF+ HGF e AFSC VEGF (Figura 41). Quantificou-se apenas as células epiteliais tubulares positivas (ANEXO 2)

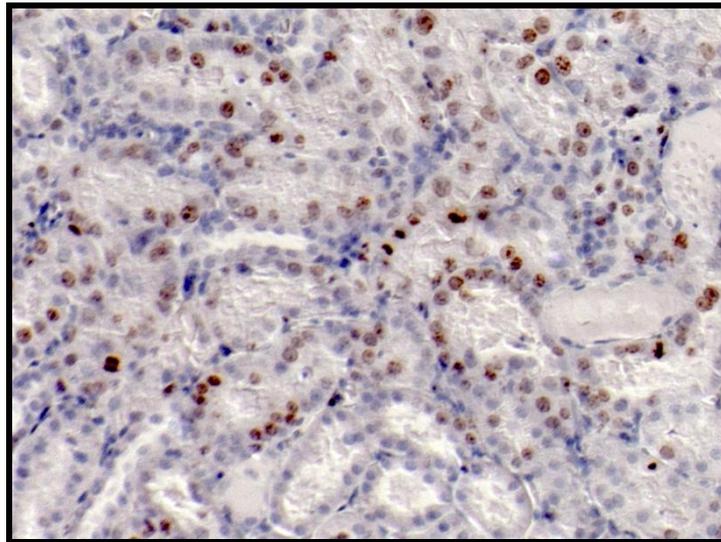


Figura 40. Imuno-histoquímica para KI-67 de tecido renal, região cortical, de um rato após 48 h de indução da lesão de isquemia e reperfusão, tratado com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (20X).

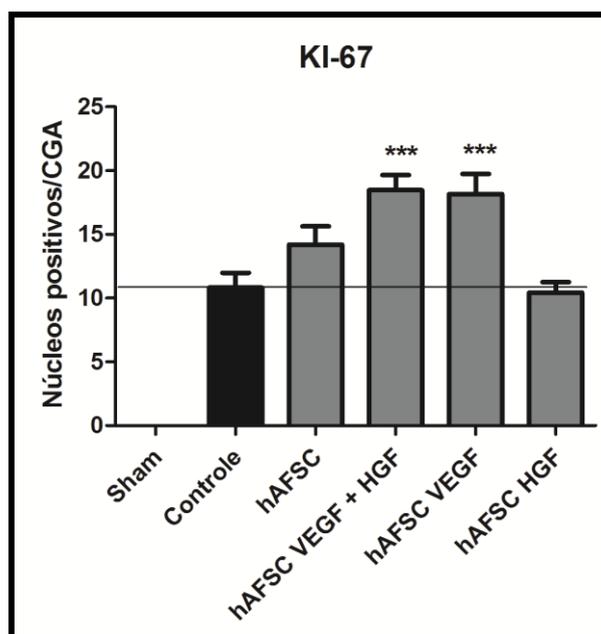


Figura 41. Análise do índice mitogênico avaliado por morfometria das lâminas coradas por imuno-histoquímica para KI-67. Gráfico indica núcleos positivos por campo de grande aumento nos diferentes grupos analisados. *** indica diferença significativa $p < 0,0001$.

Morfologia renal aos dois meses

A avaliação da fibrose intersticial foi estudada pela coloração Tricrômico de Masson, Hematoxilina & Eosina e Picrosirius Red. No momento da colheita dos rins, observou-se que alguns apresentavam irregularidades na superfície, parecendo pequenas granulações ou depressões na região cortical. Aos dois meses após a indução de isquemia e reperfusão renal já se pôde observar áreas de fibrose de graus variados nos cortes histológicos de rim corados por H&E, Tricrômico de Masson e Picrosirius Red. A fibrose pôde ser observada em todas as colorações estudadas, no entanto utilizou-se o tricrômico de Masson posteriormente para análise morfométrica, pelo maior contraste de cor entre o tecido saudável e o fibroso. A classificação feita pelo patologista encontra-se no ANEXO 3, desses dados analisou-se a fibrose subcapsular e a fibrose intersticial interna quanto à diferença estatística (Tabela 8). Nessa análise, observou-se um maior grau de fibrose renal subcapsular nos grupos controle, hAFSC VEGF e hAFSC HGF e maior grau de fibrose intersticial interna nos grupos controle e hAFSC HGF. Esses dados estão representados nas figuras 42 e 43.

Tabela 8. Média e desvio padrão dos escores de lesão tubular aguda em cortes histológicos de ratos corados por H&E nos diferentes grupos após 48 horas de lesão renal isquêmica tratados com células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humano (hAFSC) transduzidas ou não com VEGF e HGF. *difere do sham($p < 0,05$). Kruskal Wallis pós teste Dunns.

Grupo	Fibrose subcapsular	Fibrose intersticial interna
Sham ou saudáveis	0,0±0,0	0,06±0,08
Controle	2,8±1,5*	3,24±1,15*
hAFSC	1,5±1,5	2,08±1,39
hAFSC VEGF +HGF	1,033±0,79	1,66±1,08
hAFSC VEGF	2,7±1,3*	2,2±1,2
hAFSC HGF	2,8±2,02*	3,3±1,7*

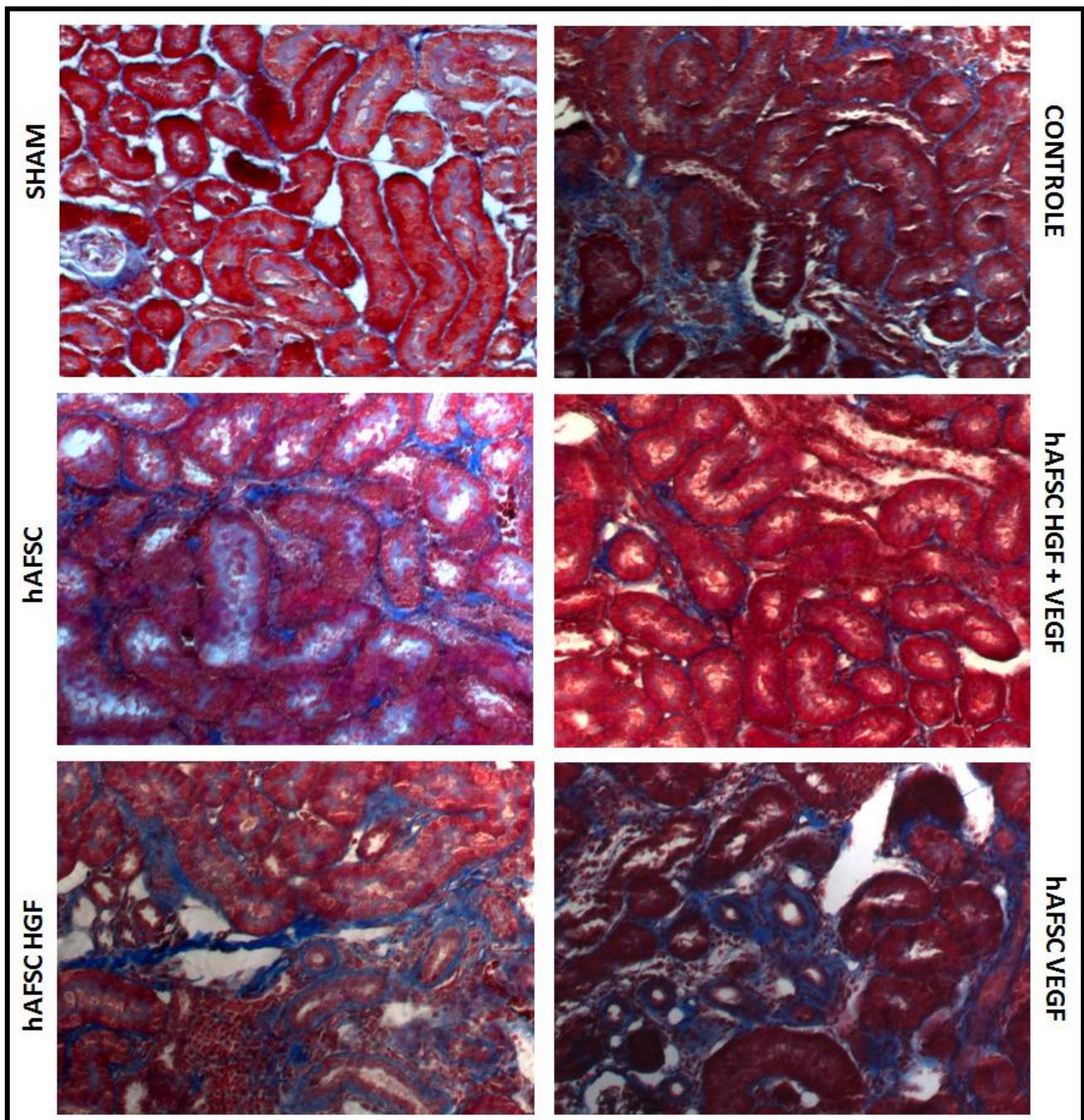


Figura 42. Fotos representativas da histologia renal 2 meses após indução de isquemia e reperfusão por 50 minutos em ratos. Cortes histológicos corados por Tricrômico de Masson, evidenciando o colágeno tipo I em azul utilizando objetiva de 20X: sham (ratos operados, sem indução de lesão e sem tratamento; controle, ratos com I/R tratados com meio de cultivo; hAFSC, ratos com I/R tratados com células estromais mesenquimais derivadas do líquido amniótico humanas (hAFSC); hAFSC VEGF + HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e HGF; hAFSC VEGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e hAFSC HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com HGF (n=5 por grupo).

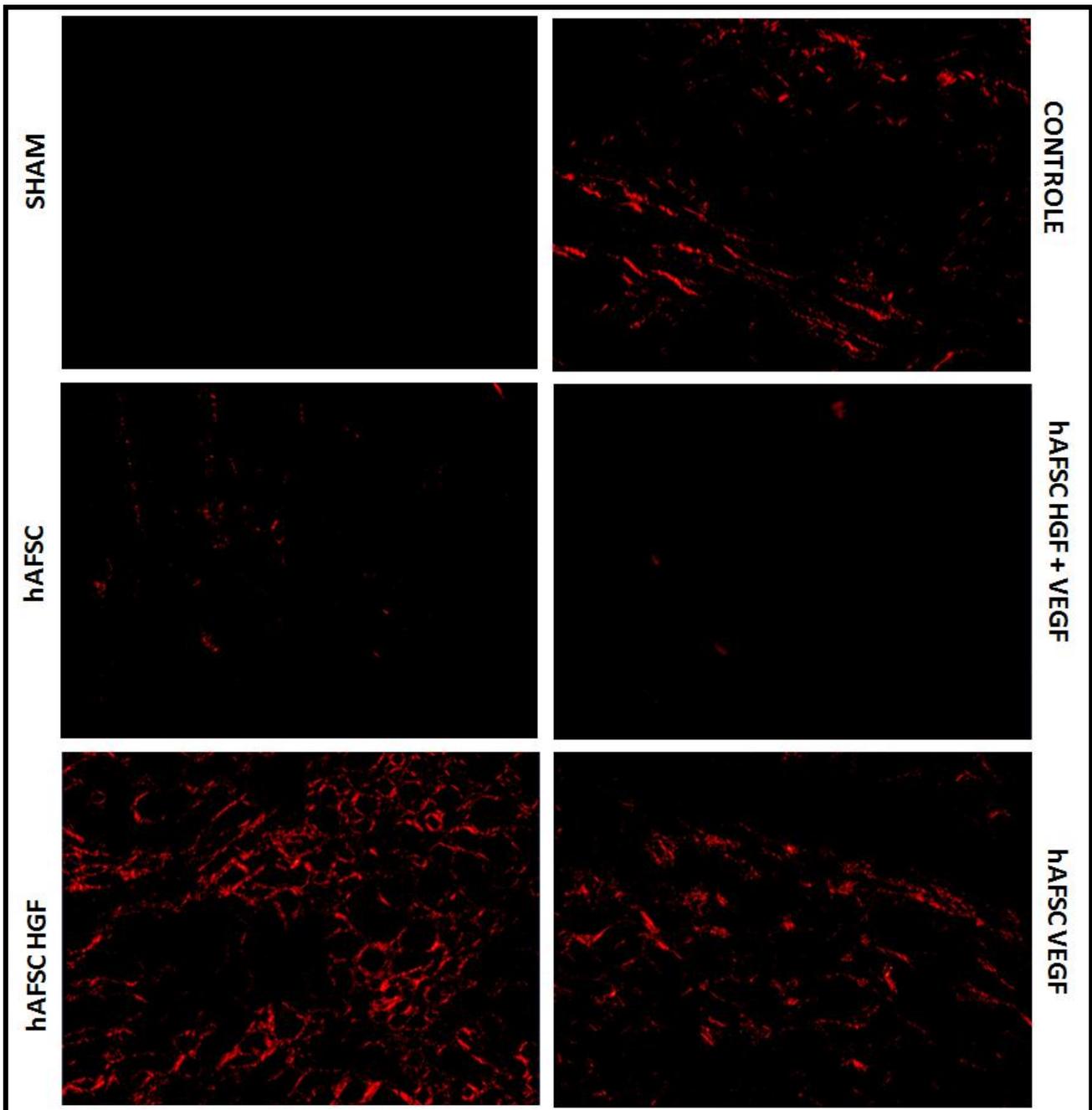


Figura 43. Fotos representativas da histologia renal 2 meses após indução de isquemia e reperfusão por 50 minutos em ratos. Cortes histológicos corados por Picrosirius red. Foto capturada com luz polarizada e objetiva de 10X: sham (ratos operados, sem indução de lesão e sem tratamento; controle, ratos com I/R tratados com meio de cultivo; hAFSC, ratos com I/R tratados com células estromais mesenquimais derivadas do líquido amniótico humanas (hAFSC); hAFSC VEGF + HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e HGF; hAFSC VEGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com VEGF e hAFSC HGF, ratos com I/R tratados com hAFSC transduzidas com HGF (n=5 por grupo)).

Análise morfométrica para fibrose renal

A avaliação da área de fibrose intersticial foi estudada pela coloração Tricrômico de Masson. Quando se comparou a área de fibrose nos diferentes grupos com grupo controle, observou-se uma área significativamente menor ($P < 0,0001$) no grupo hAFSC VEGF + HGF, sendo interessante ressaltar que nos grupos AFSC VEGF e AFSC HGF observou-se uma área ainda maior de fibrose, embora não significativa estatisticamente (Figura 44). A forma como foi realizada a mensuração da área de fibrose está representada pela figura no ANEXO 4.

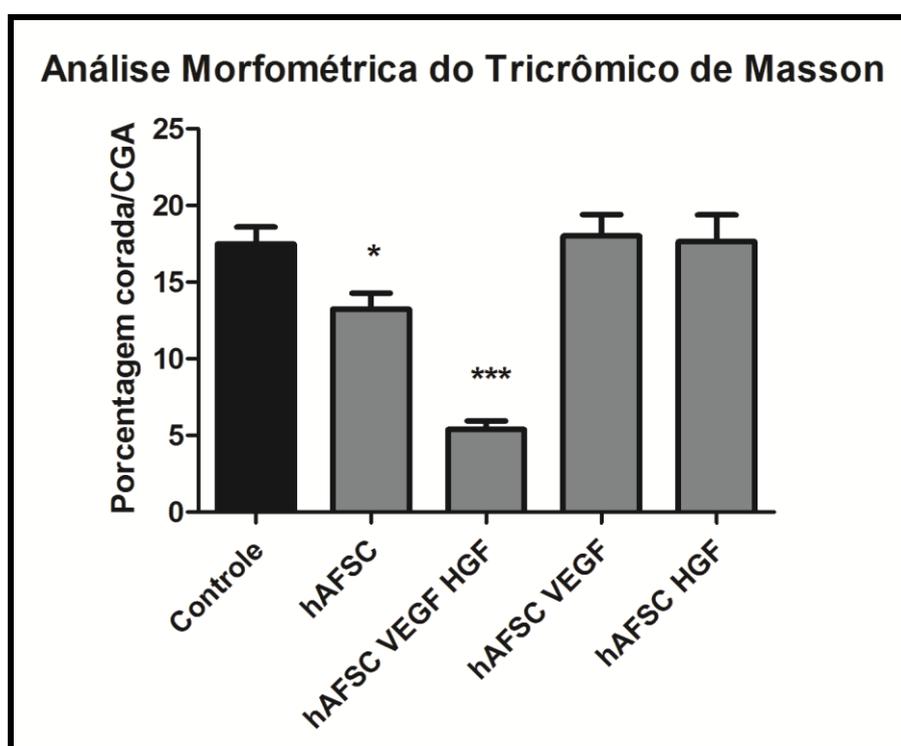


Figura 44. Análise da fibrose renal avaliada por morfometria das lâminas coradas pelo tricrômico de Masson. Gráfico indica porcentagem da área positiva por campo de grande aumento nos diferentes grupos analisados. * indica diferença comparado ao grupo hAFSC VEGF. *** indica diferença significativa $p < 0,0001$ quando comparado com todos os outros grupos. ANOVA, teste Tukey.

Formação de tumor

No momento de colheita dos materiais para análise, observou-se um tumor cutâneo, levemente aderido à musculatura de tamanho 2 cm X 0,9 cm em apenas um dos ratos do grupo AFSC VEGF, nesse mesmo animal observou-se que o valor do VEGF sérico triplicou em relação a um animal saudável. Esse mesmo aumento significativo foi observado em outro animal do mesmo grupo. O tumor foi classificado por um patologista como hemangioma.

4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, as CTs surgiram como uma ferramenta promissora na medicina regenerativa. Suas características de auto-renovação e pluripotência sugerem que elas podem ser úteis para reparar o tecido lesionado e reconstruir órgãos danificados (STOCUM, 2001). O líquido amniótico despertou recentemente o interesse de cientistas como uma fonte alternativa de células pluripotentes. Sabe-se há muito tempo da presença de células maduras, já diferenciadas, tais como células musculares lisas, osteoblastos e células epiteliais do pulmão (TSANGARIS et al., 2005) e recentemente identificou-se a presença de células progenitoras (DE COPPI et al., 2007). Estas hAFSCs foram facilmente obtidas por meio de amniocentese, e teve a grande vantagem de evitar as preocupações éticas associadas com o uso de ESCs, além de ser facilmente propagadas em cultivo, mantendo a capacidade pluripotencial.

A aplicação de terapia celular requer importantes escolhas, entre elas a fonte, a qual deverá ser fácil e rapidamente expandida em grandes quantidades, mantendo as suas características homogêneas e livre de patógenos ou xenógenos. De acordo com a literatura (DE COPPI et al., 2007; PHERMTHAI, et al., 2010; ROUBELAKIS et al., 2011), focou-se esse estudo em dois métodos diferentes de isolamento de hAFSCs para tratamento médico: a seleção c-Kit (DE COPPI et al., 2007) e a seleção mecânica, por meio de uma “célula de partida” para produção clonal (PHERMTHAI, et al., 2010;. ROUBELAKIS et al., 2011). Seguindo o protocolo de Imunoseleção para c-kit, não foi possível isolar uma população homogênea de hAFSC como mostrado por uma morfologia heterogênea das células em cultura e pela obtenção de populações com diferentes graus de positividade para o marcador CD117, sendo então obtido apenas um enriquecimento de células que expressassem este marcador. Além disso, esse método é apropriado apenas para pesquisa, uma vez que é necessária a utilização de anticorpos criados a partir de animais. A fim de tornar as células seguras para uso humano, preferiu-se o foco desse estudo na técnica de seleção mecânica, método no qual não se utilizam substâncias xeno-imunológicas, permitindo o desenvolvimento e o aprimoramento de um sistema de produção xeno-livre.

O estudo realizado por DE COPPI et al. (2007) estabeleceu uma linhagem celular utilizando cultura celular primária do líquido amniótico, isolamento das AFSC c-kits+ e a derivação de uma linhagem clonal oriunda de uma única célula. Utilizando o método de isolamento mecânico de uma célula de partida, essas três etapas podem ser combinadas em apenas um passo. Isso faz com que esse protocolo seja simples e rápido de ser realizado. Além disso, a linhagem de células clonais obtida do líquido amniótico tem uma alta homogeneidade, como observado pela citometria de fluxo. Dessa forma, esse método possibilita a seleção específica de uma linhagem que se aplique em diferentes terapias médicas, de acordo com a necessidade de expressão de diferentes marcadores de

superfície e do tipo de lesão. No caso desse estudo, selecionou-se uma linhagem que expressasse CD117 e CD24, visto que o CD117 é um marcador de pluripotência e o CD24 de células precursoras renais (PERIN et al., 2007).

Para a seleção das células de partida em uma cultura primária, utilizaram-se células que estavam ativamente em proliferação, tendo a mesma morfologia e sendo equidistantes umas das outras. A análise da expressão de clones derivados de células individuais de partida, determinada pela análise FACS, documentou a presença de marcadores mesenquimais como CD44, CD90, CD73, CD29, HLA-ABC, CD105 e uma expressão de c-kit (CD117) e CD24 variáveis e ausência de marcadores CD hematopoiéticos (CD34 e CD45), assemelhando-se ao fenótipo das MSCs descritas como critérios padrão (DOMINICI al. de 2006). Para demonstrar ainda mais o potencial de pluripotencialidade foi possível diferenciar as hAFSCs em múltiplas linhagens mesodérmicas (adipogênica, osteogênica e condrogênica) em amostras originadas de todas as semanas gestacionais.

O Oct-4 desempenha um papel crítico na manutenção da pluripotência e auto-renovação das ESCs (NIWA et al., 2000; PESCE & SCHOLER, 2001) e é especificamente expresso em células tronco embrionárias (ESCs), mas também pode ser detectada em CTA tais como derivadas da medula óssea de células mesenquimais estromais (POCHAMPALLY et al., 2004). Esperava-se que todas as linhagens expressassem Oct-4, no entanto detectou-se esse a expressão desse gene somente nas linhagens derivadas da 19^o e da 22^o semana, indicando que existe uma variação grande entre as amostras.

A fim de ser capaz de selecionar as células transduzidas, investigou-se um processo de seleção baseado na imunoseleção por CD34. As experiências anteriores mostraram que a seleção baseada em genes de resistência quimioterapêuticos (Blasticidine, puromicina e higromicina) resultou na morte de todas as células (transduzidas e não transduzidas, dados não mostrados). A seleção baseada em FACS sorting usando eGFP é viável, mas requer manipulação semi-estéril de células e depende da disponibilidade desse equipamento de classificação celular. Como uma alternativa explorou-se a seleção MACS usando anticorpos magneticamente marcados. Como as hAFSC não expressam o marcador hematopoiético CD34, optou-se por utilizar uma versão truncada da proteína CD como alvo para o anticorpo.

Um dos objetivos da terapia celular é utilizar as células-tronco como vetor para introduzir genes terapêuticos em um órgão deficiente. Nesse estudo demonstrou-se que as hAFSCs mecanicamente selecionadas são eficientemente transduzidas com o vetor lentiviral expressando genes repórteres LacZ e GFP, e com genes terapêuticos HGF e VEGF, com nenhum efeito de silenciamento após múltiplas passagens em cultura, além de ter conservado a expressão de

marcadores mesenquimais e do potencial de diferenciação. Observou-se inclusive que após transdução com VEGF, aumentou o potencial de diferenciação em linhagens osteogênicas e condrogênicas das AFSCs, o que as torna interessantes para a terapia de afecções ortopédicas.

Comprovou-se a eficácia da transdução das hAFSCs com VEGF e HGF por meio de PCR em tempo real e imunofluorescência, obtendo-se uma superexpressão de 121 vezes e 4451 vezes, respectivamente. A elevada eficiência de infecção das AFSCs e sua capacidade de manter o potencial mesenquimal após a infecção faz dessas células candidatas ideais para aplicações de terapia celular e gênica.

O mecanismo de ação da melhora da função renal após a terapia com células-tronco ainda não foi totalmente elucidado. Alguns estudos sugerem que ocorra fusão das MSCs com as células tubulares residentes; outros estudos sugerem que as MSCs são capazes de se diferenciar em células residentes renais, no entanto a ação parácrina é a que tem sido mais aceita ultimamente, pela secreção de fatores de crescimento, tais como VEGF, HGF e IGF-1, mediando uma ação antiapoptótica e mitogênica (TÖGEL et al., 2005; BI et al. 2007). Assim como as MSCs, tem sido documentada a secreção de níveis elevados de fatores de crescimento pelas AFSC, tais como o VEGF, no entanto as MSCs têm uma secreção muito mais elevada do HGF.

A existência de um sistema progenitor renal em rins de mamíferos adultos leva os pesquisadores a questionarem por que a capacidade regenerativa do rim manifesta somente em alguns casos e por que a lesão não leva à geração de novos néfrons, apesar da alta similaridade estrutural e molecular, assim como ocorre em fetos de humanos e em peixes. ROMAGNANI (2009) acredita que, provavelmente, isso ocorra devido à rápida interposição de tecido fibroso, o qual confere uma vantagem de sobrevivência pela prevenção de infecção e a desvantagem de prejudicar a regeneração tecidual. O desvio entre a cicatrização por regeneração e a por formação de tecido fibroso é principalmente controlada pela resposta imune, explicando porque fetos humanos, assim como os peixes, os quais possuem o sistema imune imaturo, cicatriza sem a formação de cicatriz e pode gerar novos néfrons (MESCHER & NEFF, 2005; SAGRINATI et al., 2006). Dessa forma, a inibição da inflamação e o retardamento do processo fibroso, permite que as células tubulares proliferem e regenerem o rim, antes que ocorra deposição de colágeno e matriz extracelular. Além disso, após evento isquêmico renal ocorre microvasculopatia pós-isquêmica, que é caracterizada por edema das células endoteliais levando subsequentemente à oclusão microvascular, em um fenômeno de não-refluxo, o qual inibe a reperfusão (PATSHAN et al., 2012), dessa forma a utilização de uma terapia que module a inflamação, irá consequentemente ter um efeito nefroprotetor, evitando a perpetuação da isquemia renal. Dada a importância da inflamação na patofisiologia da LRA (HUMPHREYS & BONVENTRE, 2008), foi importante considerar mecanismos imunomodulatórios, que ocasionaria uma renoproteção.

A administração de proteínas recombinantes é limitada na prática clínica devido ao seu alto custo. Em comparação com a administração de proteínas recombinantes, a terapia genética tem a vantagem de poder sustentar a expressão do gene (SUZUMURA et al., 2008). Estudos recentes têm estabelecido sistemas de distribuição de vários genes de fibrose tecidual por meio de manipulação genética (YANG et al., 2001; SUZUMURA et al., 2008). No entanto, devido às limitações próprias dos sistemas virais e não-virais, a sua utilização clínica é também limitada. Portanto, a partir de um ponto de vista clínico, necessita-se de um método de transferência genética segura que alcance uma expressão em longo prazo. Esta entrega de gene utilizando o sistema *ex vivo* tem várias vantagens. Primeiro, a eficiência de transdução; a duração da expressão tanto de HGF quanto de VEGF *in vivo* é controlável, visto que as MSCs administradas não sobrevivem por muito tempo após transplante. Em segundo lugar, o transplante das células alvo após a transdução de genes *in vitro* evita o contato direto com o vírus no corpo, diminuindo uma potencial toxicidade.

A diminuição de células transduzidas com HGF tCD34+ após imunoseleção e algumas semanas em cultura indica que as células positivas foram afetadas de alguma forma, ou pela diminuição da sua taxa proliferativa ou devido à indução de apoptose. Ocorreu aumento em 4451 vezes o valor de expressão de HGF nas hAFSC após transdução com vetores lentivirais codificando HGF tCD34. Possivelmente o valor absoluto de secreção de HGF não é tão elevado, visto que, ao contrário das MSCs da medula óssea, as AFSCs quase não secretam HGF (HAUSER et al., 2010) e o PCR em tempo real foi realizado tendo as AFSCs como controle. Possivelmente ocorreu um aumento na porcentagem de células positivas visto que as hAFSC VEGF apresentaram uma taxa de crescimento maior do que a sua forma *in natura*.

Foi possível aumentar o nível de expressão de VEGF e HGF mantendo-se as características tronco da linhagem celular utilizada, incluindo a mesma imunofenotipagem e mesmo potencial de diferenciação. Utilizar células tronco transgênicas teve a vantagem de ter um efeito sinérgico pelo tratamento celular e gênico, provendo uma maior secreção de dois dos mais importantes fatores de crescimento para a regeneração renal. Dessa forma, o VEGF atuou na angiogênese, mitogênese e no efeito antiapoptótico e o HGF atuou principalmente no retardo da ativação de miofibroblastos e consequentemente da fibrose renal.

O processo de reparo da lesão requer a capacidade de diminuir a velocidade de resposta fibrótica (ROMAGNANI et al., 2009), pela diminuição da inflamação e imunomodulação, dando tempo para que as células progenitoras proliferem e possam regenerar o tecido e ao mesmo tempo prevenir o acúmulo de matriz extracelular por meio de secreção de fatores de crescimento. Dessa forma, a terapia celular nesse estudo teve como objetivo modular a inflamação e prover uma concentração ainda maior dos principais fatores de crescimento para a regeneração renal.

A lesão por isquemia e reperfusão é uma das causas da LRA e ela ocorre em diversas

situações clínicas, incluindo o transplante renal, cirurgia da artéria renal, cirurgia da aorta suprarrenal e certos estados hipotensivos. O efeito a longo prazo na lesão de I/R tem sido de especial interesse no transplante renal (VANES et al., 1983; GJERTSONDW, 1991), visto que o órgão após a remoção do doador rapidamente desenvolve sinais de isquemia, apesar do adequado resfriamento e uso de fluidos preservativos (GUELER et al., 2004). O tempo de isquemia renal de 50 minutos utilizado nesse estudo foi efetiva para causar a lesão, caracterizado pelo aumento significativo da creatinina, um dos exames mais utilizados para determinação da função glomerular (FINCO, 1971; DIBARTOLA, 1997), sendo que seu aumento ocorre quando pelo menos 75% dos néfrons estão afuncionais, ou seja, houve lesão generalizada dos rins nesse estudo.

Inicialmente considerou-se o transplante celular por via intrarrenal, pelo fato de ser próxima ao órgão alvo (BANTUBUNGI et al., 2008), no entanto tem sido observado que as células transplantadas por essa via frequentemente morrem antes de uma contribuição significativa na resposta de cura devido à limitada difusão de nutrientes e oxigênio (MUSCHLER et al., 2004). Dessa forma, optou-se pela administração da terapia celular o mais próximo possível da artéria renal, por possuir maior chance de enxertia de uma alta concentração de células dentro da área de interesse, além de prevenir o *homing* de células transplantadas para outros tecidos são desejáveis.

Considerou-se a inserção do cateter de forma normógrada (crânio-caudal), pelo fato de as células serem administradas na mesma direção do fluxo sanguíneo, no entanto observou-se que a extremidade do cateter ficava além das artérias renais, além de ser necessária uma maior dissecação da aorta, visto que na região suprarrenal o acesso é mais difícil. Dessa forma, optou-se pela inserção retrógrada do cateter, de forma que a extremidade do cateter ficasse imediatamente cranial às artérias renais. A colocação dos clampes tanto na aorta, caudal aos rins e na artéria renal contralateral ao rim alvo, permitiu que o único direcionamento possível fosse a artéria renal do lado em questão, distribuindo de forma homogênea a tinta nanquim.

Ocorreu a morte de três ratos alguns minutos após a administração das hAFSCs HGF em três ratos. Acredita-se que a causa seja a obstrução vascular de um vaso importante, possivelmente pela diminuição significativa da velocidade sanguínea nos vasos após a administração das MSCs já documentada (FURLANI et al., 2009), além de ter sido observado que as hAFSCs transduzidas com HGF apresentaram um aumento de volume celular, o que pode ter favorecido o embolismo nesses animais. Por meio de angiografia observou-se redução do fluxo sanguíneo após transplante celular, bem como evidências de obstrução microvascular, alertando os médicos para uma possível limitação de administração sistêmica ou intra-arterial de MSCs (WALCZAK et al., 2008; FURLANI et al., 2009).

Para determinar se as hAFSCs transplantadas iriam migrar e enxertar no rim lesionado, injetaram-se AFSC marcadas com Lac-z; alguns pesquisadores têm comprovado que as MSCs

enxertam no rim após evento isquêmico, sendo que essas taxas são muito baixas (LIN et al., 2003) e maiores em transplante autólogo e alógeno (TOGEL et al., 2009). Decidiu-se realizar o transplante celular 6 horas após a indução da lesão para que houvesse a secreção dos fatores quimiotáticos no rim lesionado, os quais estimulam a migração das MSCs. Ainda assim, não foi possível identificar nenhuma célula marcada nos cortes histológicos analisados no tecido renal, sendo observado somente no pulmão e baço. Acredita-se que o efeito observado após a terapia celular foi devido à secreção de fatores solúveis das células presentes em outros órgãos, no entanto acredita-se que as hAFSC que eventualmente tenham enxertado no rim tenham entrado em apoptose, pois apesar de as MSC apresentarem quimiotaxia pelos locais de inflamação, este microambiente hostil do tecido lesado, incluindo a isquemia e a fibrose, pode diminuir a sobrevivência das MSCs exógenas (SY et al., 2011). TOGEL et al., (2008) também observaram redução contínua das MSCs marcadas com luciferina detectadas por bioluminescência. Os autores justificaram essa redução pela contínua apoptose, visto que não se observou o deslocamento dessas células para outras regiões.

A renovação das células tubulares basais renais é excessivamente baixo e parece ocorrer pelas células epiteliais tubulares terminalmente diferenciadas (VOGETSEDER et al., 2005). Ainda que em taxas menores do que os grupos hAFSC e hAFSC VEGF+HGF, observou-se proliferação das células tubulares mesmo nos animais controles, da mesma forma como relatado por outros autores que observaram que epitélio tubular regenera após lesão renal aguda e que células tubulares diferenciadas proliferam e migram para repor as células vizinhas que sofreram apoptose (LIU et al., 2005; DUFFIELD et al., 2005; LIU & BRAKEMAN, 2008). Isso reflete a habilidade intrínseca de sobrevivência das células tubulares para se adaptar à perda das células adjacentes por meio de desdiferenciação e proliferação, com o intuito de repor as células que morreram com o insulto renal. Levando em consideração a alta capacidade de proliferação das células tubulares no rim lesado, acredita-se que as próprias células tubulares são a fonte do reparo do néfron (BONVENTRE, 2003).

Estudos foram realizados comparando a aplicação intravenosa sistêmica e a aplicação direta na artéria renal, sendo observada uma maior melhora mais pronunciada na função renal quando administradas arterialmente (TOGEL et al., 2008; ZONTA et al., 2010). Outro estudo em camundongos realizado por SCHREPFER et al. (2007) demonstrou que a aplicação por via sistêmica intravenosa não era apropriada para atingir os seus locais de inflamação. ZONTA et al. (2010) acreditam que isso tenha ocorrido pelo fato de haver maior migração de células para outros órgãos quando aplicado por essa via. Atualmente acredita-se que essa migração ocorra principalmente devido ao tamanho das CTs serem maiores que os pequenos capilares pulmonares, formando um filtro e prendendo as células no pulmão (SCHREPFER et al., 2007; FISCHER et al., 2009). Assim como observado por outros autores (BARBASH et al., 2003; RUSTER et al., 2006), as AFSC administradas nesse estudo localizavam-se principalmente no pulmão e baço após 24 do

transplante celular. BARBASH et al. (2003) explicaram o elevado encarceramento pulmonar de células sistemicamente infundidas, devido ao seu grande volume celular comparado aos microcapilares pulmonares (BARBASH et al., 2003). No estudo realizado por WALCZAK et al. (2008) o tamanho das MSCs variou entre 20 e 50 μm e, embora as células fossem capazes de ultrapassar a barreira intravascular, ocorreu o aprisionamento na vasculatura em 17% dos animais, indicando risco evidente de oclusão vascular (WALCZAK et al., 2008).

Em modelos animais, existe uma relação direta entre a rarefação dos capilares peritubulares e o desenvolvimento de cicatrizes glomerulares e tubulointersticiais. Ocorre redução da densidade capilar após um mês do evento isquêmico e não há evidências de resolução após esse período, possivelmente em decorrência da diminuição da expressão de fatores angiogênicos e o aumento da expressão de inibidores da angiogênese (BASILE et al., 2008). Alguns pesquisadores acreditam que isso favoreça subsequentemente o desenvolvimento de fibrose intersticial (BASILE et al., 2001; BASILE et al., 2007). Essa lesão é progressiva visto que o aumento da fibrose irá consequentemente comprometer a microvasculatura, diminuição da oxigenação e os nutrientes para as células tubulares, aumento do estresse oxidativo tubular e da lesão das células tubulares, possivelmente interferindo com o processo regenerativo e levando a uma maior fibrose (BASILE et al., 2007). Dessa forma parece ser interessante a terapia de reposição de VEGF, o qual possivelmente aumenta a neovascularização e diminui a inflamação (BASILE et al., 2008) e consequentemente a fibrose, influenciando tanto a curto prazo na recuperação renal pelo aumento da proliferação tubular, como evitando a progressão para DRC.

Em um modelo de lesão renal induzido por cisplatina, trataram-se camundongos com ESC transduzida com VEGF, levando a um benefício na recuperação renal ainda maior do que as ESC não transduzidas. Esses efeitos foram relacionados ao aumento da densidade microvascular e da mitose e ao menor índice de apoptose (YUAN et al., 2011). Apesar de serem descritos diversos benefícios do VEGF, observou-se nesse estudo uma lesão renal mais pronunciada do que o controle no grupo tratado com hAFSC VEGF, tanto em relação à função renal quanto à necrose tubular. Possivelmente em decorrência de uma dose muito elevada de VEGF, tornando-se tóxico. Visto que o volume celular das hAFSCs transduzidas com VEGF serem ainda menores do que as AFSCs não transduzidas, descarta-se a ocorrência de fibrose por embolismo das arteríolas renais. CHADE (2012) citou alguns possíveis riscos associados ao uso de VEGF, principalmente quando em altas doses, entre elas o risco de hipotensão, visto que esse fator de crescimento é um potente vasodilatador; além de aumentar a permeabilidade dos neovasos, diminuindo a sua funcionalidade e permitindo o maior extravasamento de citocinas inflamatórias para o espaço extracelular e ainda pelo risco de formação de tumores e arterioesclerose.

Quando mensurou-se a concentração sérica de VEGF por ELISA não observou-se um

aumento significativo nos grupos tratados comparado com o grupo controle. Pelo fato de o VEGF ser um mediador parácrino, níveis sistêmicos podem não refletir adequadamente alterações no VEGF localmente. Além disso, a determinação do nível sérico ou plasmático do VEGF pode alterar no momento da colheita, pela sua liberação pelas plaquetas e leucócitos (SCHRIJVERS et al., 2004), podendo ser um dos motivos de não ter sido observada elevação significativa pelo teste ELISA do VEGF sérico nos grupos nos quais esperava-se uma elevação desse fator de crescimento: hAFSC VEGF e hAFSC VEGF + HGF.

Observou-se um efeito benéfico da terapia com hAFSC observado pela melhora na função renal e menor índice fibrótico a longo prazo, no entanto obteve-se um efeito ainda melhor quando associaram-se as hAFSCs transduzidas com VEGF e HGF. Já em 24 h observou-se o efeito renoprotetor, pela redução significativa da creatinina tanto no grupo AFSC quanto no grupo AFSC VEGF+HGF. Em 48h esse efeito foi ainda mais pronunciado no grupo AFSC VEGF +HGF, observado pela diferença altamente significativa do valor de creatinina em relação ao grupo controle, provavelmente em decorrência do efeito mitogênico, indicando regeneração.

Houve um aumento significativo da mitose nos túbulos renais nos grupos hAFSC VEGF +HGF e no grupo hAFSC VEGF, indicado pela maior expressão de Ki-67. Associou-se esse maior número de células positivas nesses grupos ao estímulo causado pelo VEGF, visto que se sabe que esse fator de crescimento é mitogênico, estimulando a mitose até mesmo no grupo hAFSC VEGF no qual havia necrose tubular intensa. O maior índice nesse grupo não foi devido à presença de miofibroblastos que também expressam marcadores mitogênicos (FORBES et al., 2000), visto que quantificaram-se apenas as células positivas presentes nos túbulos renais. Apesar do HGF ser também descrito como mitogênico (OHMACHI et al., 1996), não foi possível observar esse efeito por meio de análise imuno-histoquímica.

Estudos recentes sugeriram que o HGF é uma potente proteína renoprotetora que desempenha um papel crítico na promoção da reparação e na regeneração tubular renal após os estímulos nocivos (KAWAIDA et al., 1994; MILLER et al., 1994; NIGAM et al., 2000; VARGAS et al., 2000), e é um potente fator de sobrevivência protegendo as células epiteliais tubulares renais da apoptose (YANG et al., 2001; KUAN, 2008). HGF é descrito como um dos fatores de crescimento mais importantes para a inibição de fibrose renal, visto que tem efeito anti-inflamatório pela supressão das células NK e do TNF- α (GONG et al., 2006). Outro efeito do HGF que diminui a ocorrência de fibrose é a modulação do equilíbrio entre a síntese de matriz extracelular e a sua degradação pelo aumento da expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) e redução da produção de inibidores de MMP (MIZUNO et al., 2000). Adicionalmente, o HGF tem efeito antagônico ao TGF- β 1, o qual inibe a proliferação das células dos túbulos renais *in vitro* e estimula a formação de matriz extracelular, agregação celular e apoptose (NOWAK et al., 1996) além de

diminuir a síntese de genes associados com a matriz extracelular (fibronectina e colágeno IV).

Já havia sido realizada a transdução de MSC com HGF, no entanto utilizando vetores adenovirais (YU et al., 2008; CHEN et al., 2011), os quais apresentam expressão transiente de HGF. Quando se injetaram-se 1×10^6 MSCs derivadas do cordão umbilical transduzidas com HGF, utilizando vetores adenovirais em ratos com lesão I/R houve melhora significativa da função renal somente 72 horas após o tratamento comparado com os outros grupos, caracterizado pelo efeito mitogênico, antiapoptótico e anti-inflamatório desse fator de crescimento (CHEN et al., 2011). LIU et al. (2011) também observaram a prevenção da fibrose renal em modelos de obstrução ureteral unilateral em MSC transduzida com HGF, sendo observado esse mesmo resultado em camundongos com lesão renal espontânea, no qual o HGF inibiu o TGF- β 1 (MIZUNO et al., 1998).

Em ratos tratados com HGF humano e de ratos por 28 dias, observou-se proteinúria, albuminúria e hipertrofia glomerular apenas quando se administrou HGF humano, além do depósito de anticorpos contra HGF humanos em áreas mesangiais e de estimular a produção de TGF- β 1. Esses autores concluíram que esse efeito ocorre mediado por deposição de imuno-complexos (MIZUNO et al., 2011). Esse mesmo efeito foi observado por IDO et al. (2011) quando o HGF foi administrado por 14 dias, sendo observado que a lesão ocorre de maneira dose-dependente. Observou-se proteinúria e albuminúria a partir de quatro dias após o início do tratamento, no entanto sem que houvesse aumento de ureia e creatinina. Os valores de proteína e albumina retornaram aos valores basais após a interrupção do tratamento, no entanto ocorreram alterações histológicas, tais como deposição hialina nos glomérulos e túbulos e hipertrofia renal. No presente estudo também se observou aumento da necrose tubular e de cilindros hialinos no grupo tratado com 1×10^6 hAFSC HGF. Acredita-se que isso tenha ocorrido por duas hipóteses: formação de embolismo renal, já que três animais morreram imediatamente após o transplante celular e observou-se aumento do volume celular nas hAFSC HGF favorecendo a oclusão vascular, ou uma dose tóxica de HGF, já que esse efeito não foi observado no grupo tratado com metade do número de hAFSC HGF. Existe ainda a possibilidade de ter ocorrido deposição de imunocomplexos, já que as hAFSC administradas foram transduzidas com HGF humano.

A redução na expressão de α -SMA e TGF- β é indicadora de inibição da fibrose, visto que os miofibroblastos aumentam a deposição de matriz extracelular, levando à atrofia tubular e glomerular e o TGF- β 1 é um mediador central que regula a transdiferenciação de células epiteliais tubulares em miofibroblastos α -SMA-positivos (EFSTRATIADIS et al., 2009). Observou-se redução da expressão de α -SMA e TGF- β em 48h nos grupos hAFSCs, hAFSC VEGF+HGF e hAFSC HGF, coincidindo o resultado com a fibrose intersticial aos dois meses nos grupos hAFSC e hAFSC VEGF+HGF, mas não no grupo hAFSC HGF indicando que provavelmente nesses animais a fibrose ocorreu por outra via ou inicialmente o HGF pode inibir o TGF- β 1, no entanto após o

período de avaliação, perdeu-se o equilíbrio entre esses fatores de crescimento em decorrência da intensa necrose tubular, ocorrendo liberação de TGF- β 1 pelas células inflamatórias e conseqüentemente inibindo a transcrição do gene HGF (INOUE et al., 2002), desenvolvendo o processo fibroso (HAYASHI et al., 2010). Outros grupos também observaram a redução da expressão de TGF- β 1 e α -SMA em ratos em que se induziu DRC pelo modelo nefrectomia 5/6 quando administraram-se plasmídeos expressando HGF (WANG et al., 2011).

Visto que a efetividade terapêutica das MSCs em lesões renais agudas é mediada primariamente por um mecanismo parácrino, a presença prolongada das MSCs no local de lesão poderia melhorar ainda mais a efetividade das células administradas (TOGEL et al., 2008). Dessa forma, estratégias que aumentem o índice de adesão e enxertia e a quimiotaxia para diferentes órgãos alvos estão em desenvolvimento e incluem a engenharia genética de propriedades de superfície (SACKSTEIN et al., 2008).

Sugere-se maior investigação do efeito deletério observado pela administração de 1×10^6 AFSC transduzidas tanto com VEGF e quanto com HGF no tratamento de lesão renal isquêmica. Caso esse efeito ocorra devido a uma eventual dose tóxica desses fatores de crescimento, indicam-se exames para mensurar a secreção desses pelas AFSCs, sendo então possível calcular uma dose terapêutica. Essa dose seria individual, dependendo da linhagem utilizada, visto que depende da porcentagem de células eficientemente transduzidas, e que estejam secretando tais proteínas.

Apesar de não ter sido até o momento relatada a ocorrência de tumores após administração de AFSC, observou-se nesse estudoA formação do tumor cutâneo em um rato do grupo VEGF pode ter sido ao acaso, ou em decorrência das altas concentrações de VEGF. É necessária a realização de testes, tais como HLA-AB, para avaliar se as hAFSC estariam presentes na massa tumoral, confirmando que as células transplantadas foram a causa desse tumor. Nesse mesmo animal e em outros dois animais do mesmo grupo observaram-se altas concentrações de VEGF detectado por ELISA. Sabe-se que massas tumorais secretam VEGF (PINEDO et al., 2000), sugerindo dessa forma, que pode ser que outros animais apresentassem massas tumorais que não foram observadas quando se realizou a eutanásia. Outra possibilidade é que algumas hAFSCs VEGF transplantadas teriam enxertado em algum órgão e estariam secretando VEGF.

Após o transplante renal observa-se a ocorrência de fibrose intersticial e atrofia tubular, o que leva posteriormente à perda e à disfunção do aloenxerto (PARK et al., 2010). Essa fibrose intersticial está associada não somente ao uso de imunossuppressores e pela rejeição, mas também devido à lesão de I/R (BASILE et al., 2001), o que pode ocasionar atraso no retorno da função do enxerto e até mesmo da sobrevivência do órgão transplantado (YARLAGADDA et al., 2009). Dessa forma, a terapia celular com AFSC transduzida com VEGF e HGF poderia ser útil em casos de transplante renal por modular a fibrose no órgão transplantado, por meio de maior

neovascularização e inibição de TGF- β 1 do que as AFSCs não transduzidas.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados, pode-se concluir que a terapia celular utilizando a associação das células mesenquimais estromais derivadas do líquido amniótico humanas transduzidas (AFSC) com VEGF e HGF resultou em efeito renoprotetor ainda maior do que sua forma não transduzida após evento isquêmico em ratos, observado tanto a curto prazo, pelo maior índice mitogênico, melhor função renal e inibição de genes fibrogênicos, quanto a longo prazo pelo menor índice fibrótico. A ação mitogênica ocorreu pela secreção de VEGF e a ação antifrótica pela secreção de HGF, fazendo dessa associação interessante para casos isquêmicos renais, tais como casos de cirurgias extensas hipotensivas ou transplante renal.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABBATE, M.; BROWN, D.; BONVENTRE, J. V. Expression of NCAM recapitulates tubulogenic development in kidneys recovering from acute ischemia. **American Journal Physiology**, v. 277, n.3, p. F454–F463, 1999.

AILAWADI, M.; et al. Adenovirus vector-mediated transfer of the VEGF cDNA to healing abdominal fascia enhances vascularity and bursting strength in mice with normal and impaired wound healing. **Surgery**, v.131, n.2, p. 219-227, 2002.

ANDREWS, P. W. et al. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. **Biochemical Society Transactions** , v. 33, n. 6, p. 1526-1530, 2005.

ANKRUM, J.; KARP, J. M. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. **Trends in Molecular Medicine**, v.16, n.5, p.203-9, 2010.

ASAKURA, A.; KOMAKI, M.; RUDNICKI, M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. **Differentiation**, v.68, n.4-5, p.245-53, 2001.

ASANUMA H, et al. Arterially delivered mesenchymal stem cells prevent obstruction-induced renal fibrosis. **Journal of Surgical Research**. v.168, n.1, p.51-9, 2011.

ASKENAZI, D.J. et al. 3-5 year longitudinal follow-up of pediatric patients after acute renal failure. **Kidney International**, v. 69, n.1, p. 184-189, 2006.

BAEKELANDT, V. et al. Characterization of lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse brain. **Human Gene Therapy**, v.13, n.7, p.841-853, 2002.

BARBASH, I. M. et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. **Circulation**, v.108, n.7, p.863-8, 2003.

BASILE, D. P. et al. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences longterm function. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 281, n. 5, p. F887-F899, 2001.

BASILE, D.P. Rarefaction of peritubular capillaries following ischemic acute renal failure: a potential factor predisposing progressive nephropathy. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.13, n.1, p. 1-13, 2004.

BASILE, D. P. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. **Kidney International**, v.72, n.2, p.151-6, 2007.

BASILE, D.P., et al. Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor. **American Journal of physiology - Renal Physiology**, v.294, n.4, p. 928-936, 2008.

BEHR, L. et al. Intra renal arterial injection of autologous mesenchymal stem cells in an ovine model in the postischemic kidney. **Nephron Physiology**, v.107, n.3, p.65-76, 2007.

BEHR, L. et al. Evaluation of the effect of autologous mesenchymal stem cell injection in a large-animal model of bilateral kidney ischaemia reperfusion injury. **Cell Proliferation**, v.42, n.3, p.284-97, 2009.

BI, B.; et al. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, n.9, p. 2486-2496, 2007.

BIANCO P, ROBEY PG, SIMMONS PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, v.2, n.4, p.313-9, 2008.

BIEBACK, K. et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem Cells**, v. 22, n.4, p. 625-634, 2004.

BIEBACK, K. et al. Clinical Protocols for the Isolation and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 35, n. 4, p. 286-294, 2008.

BLANPAIN C.; HORSLEY, V.; FUCHS, E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. **Cell**, v.128, n.3 p.445-458, 2007.

BOKER, W., et al. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. **Journal of Cellular Molecular Medicine**, v.12, n.4, p.1347-1359, 2008.

BONVENTRE, J. V. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 1, p. 55-61, 2003.

BONVENTRE, J. V.; WEINBER, J.M. Recent Advances in the Pathophysiology of Ischemic Acute Renal Failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.14, n.:8, p. 2199-2210, 2003.

BONVENTRE, J. V.; YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 11, p. 4210-4221, 2011.

BOROS, P.; BROMBERG, J. S. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. **American Journal of Transplantation**, v.6, n.4, p.652–658, 2006.

BRACE, R. A. & RESNIK R Dynamics and disorders of amniotic fluid. in cresy RK & Reni K R (eds). **Maternal Fetal medicine**. Philadelphia, Saunders, 1999, p 623-643.

BRUNO, S. et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.20, n.5, p.1053-67, 2009.

BURGHARD, R. et al. Protein analysis in amniotic fluid and fetal urine for the assessment of fetal renal function and dysfunction. **Fetal Therapy**, v. 2, n. 4, p. 188–196, 1987.

BUSSOLATI B, et al. Contribution of stem cells to kidney repair. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v.4, n.1, p.2-8, 2009.

CANANZI, M. A.; ATALA, A.; DE COPPI, P. Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 18, n. 1, p. 17-27, 2009.

CARRARO, G. L. et al. Human amniotic fluid stem cells can integrate and differentiate into epithelial lung lineages. **Stem cells**, v. 26, n. 11, p. 2902-2911, 2008.

CHADE, A. R. VEGF: Potential therapy for renal regeneration. **F1000 Medical Reports**, v.4, n.1, p.1-5, 2012.

CHEN, J. et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v. 32, n.4, p. 1005-1001, 2001.

CHEN, J. et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. **Journal of Neuroscience Research**, v. 73, n.6, p.778-786, 2003.

CHIAVEGATO, A. et al. Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immuno-suppressed or immuno-deficient rat. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.42, n.4, p.746-59, 2007.

DA SACCO, S. et al. Human amniotic fluid as a potential new source of organ specific precursor cells for future regenerative medicine applications. **Journal of Urology**, v.183, n.3, p.1193-1200, 2010.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**. v119, n.Pt 11, p.2204-13, 2006.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.26, n.9, p.2287-99, 2008.

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; LUYTEN, F.P. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. **Arthritis Rheumatology**, v.44, n.1, p.85-95, 2001.

DE COPPI, P. et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 100–106, 2007.

DENG, J. et al. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. **Kidney International**, v.60, n.6, p.2118-28, 2001.

DEROOSE, C. M. et al. Seeing genes at work in the living brain with non-invasive molecular imaging. **Current Gene Therapy**, v. 9, n.3, p.212-238, 2009.

DEVARAJAN P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **Journal of American Society of Nephrology**, v.17, n.6, p.1503–20, 2006.

DIBARTOLA, S.P. Abordagem Clínica e Avaliação Laboratorial da Afecção Renal. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Moléstias do cão e do gato**. 4ed. São Paulo: Manole, 1997, cap. 132, p. 2355-2373.

DI PEPPE, R. et al. Adenovirus-mediated VEGF165 gene transfer enhances wound healing by promoting angiogenesis in CD1 diabetic mice. **Gene Therapy**, v. 9, n. 19, p. 1271-1277, 2002.

DITADI, A. et al. Human and murine amniotic fluid c-Kit+Lin- cells display hematopoietic activity. **Blood**, v.113, n.17, p.3953-60, 2009.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, n.4, p.315-317, 2006.

DUFFIELD, J. S. et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. **The Journal of Clinical Investigation**; v.115, n.7, p.1743-1755, 2005.

EFSTRATIADIS, G.; et al. Renal fibrosis. **Hippokratia**, v.13, n.4, p. 224-229, 2009.

FAUZA, D. Amniotic fluid and placental stem cells. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 877–891, 2004.

FENG, Z. et al. Fresh and cryopreserved, uncultured adipose tissue-derived stem and regenerative cells ameliorate ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.25, n.12, p.3874-84, 2010.

FINCO, D.R. Kidney Function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997, cap. 17, p. 441-484.

FINE, L. G.; ORPHANIDES, C.; NORMAN, J. T. Progressive renal disease: the chronic hypoxia hypothesis. **Kidney International Supplement**, v. 65, p. S74-S78, 1998.

FISCHER, U. M. et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. **Stem Cells and Development**, v.18, n.5, p.683-92, 2009.

FORBES, J. M. et al. Ischemic acute renal failure: long-term histology of cell and matrix changes in the rat. **Kidney International**, v.57, n.6, p.2375-85, 2000.

FREYMAN, T. et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. **European Heart Journal**, v.27, n.9, p.1114-22, 2006.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**. v.17, n.4, p.331-40, 1974.

FRIEDEWALD, J.J.; RABB, H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. **Kidney International**, v.66, n.2, p.486–491, 2004.

FURLANI, D. et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. **Microvascular Research**, v.77, n.3, p.370-6, 2009.

GATTI S, et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.26, n.5, p.1474-83, 2011.

GHIONZOLI, M. et al. Amniotic fluid stem cell migration after intraperitoneal injection in pup rats: implication for therapy. **Pediatric Surgery International**, v.26, n.1, p.79-84, 2010.

GJERTSON, D. W. Survival trends in long-term first cadaver-donor kidney transplants. **Clinical Transplants**, p. 225-235, 1991.

GOLIGORSKY, M.S. et al. Review article: endothelial progenitor cells in renal disease. **Nephrology (Carlton)**, v. 14, n. 3, p. 291-297, 2009.

GONG, R.; RIFAI, A, DWORKIN LD. Anti-inflammatory effect of hepatocyte growth factor in chronic kidney disease: targeting the inflamed vascular endothelium. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.17, n.9, p.2464-73, 2006.

GRISAFI, D. et al. High transduction efficiency of human amniotic fluid stem cells mediated by adenovirus vectors. **Stem Cells Development**, v. 17, n.5, p. 953-962, 2008.

GUELER, F. et al. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. **Kidney International**, v. 66, n. 2, p. 523–527, 2004.

HAYASHI, H. et al. Serum HGF and TGF- β 1 levels after right portal vein embolization. **Hepatology Research**, v.40, n.3, p311-317, 2010.

HERRERA, M. B. et al. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. **International Journal of Molecular Medicine**. v.14, n.6, p.1035-41, 2004.

HIRSCHBERG R, ADLER S. Insulin-like growth factor system and the kidney: physiology, pathophysiology, and therapeutic implications. **American Journal of Kidney Diseases**, v.31, n.6, p.901–19, 1998.

HSU, C.Y. et al. Community-based incidence of acute renal failure. **Kidney International**, v.72, n.2, p.208-12, 2007.

HUMPHREYS, B. D.; DUFFIELD, J. S.; BONVENTRE, J.V. Renal stem cells in recovery from acute kidney injury. **Minerva Urologica e Nefrologica**, v.58, n.4, p.329-37, 2006.

HUMPHREYS, B. D., BONVENTRE, J. V. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury.

Annual Review of Medicine, v. 59, n. p. 311- 325, 2008.

IDO, A. et al. Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor (rh-HGF) in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, p. 55, 2011

IMBERTI, B. et al. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, n. 11, p. 2921–2928, 2007.

INOUE T, et al. TGF-beta1 and HGF coordinately facilitate collagen turnover in subepithelial mesenchyme. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.297, n.2, p.255-60, 2002.

IWATANI, H.; IMAI, E. Kidney repair using stem cells: myth or reality as a therapeutic option? **Journal of Nephrology**. v.23, n.2, p.143-6, 2010.

JIANG, T. et al. Role of angiotensin II and JAK2 signal pathway in transdifferentiation of renal tubular cells in mice after acute ischemic followed by reperfusion. **Chinese Journal of Pathology**, v. 38, n.7, p.466-471, 2009.

JUNG, K.W. Perspectives on human stem cell research. **Journal of Cellular Physiology**, v. 220, n.3, p. 535-537, 2009.

KANG, D.H. et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n.3, p. 806-816, 2002.

KAVIANI, A. et al. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 36, n.11, p. 1662–1665, 2001.

KAWABATA, K. et al. Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. **Molecular Pharmacology**, v. 3, n.2, p. 95-103, 2006.

KAWAIDA, K. et al. Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n.10, p. 4357-61, 1994.

KIM, D.; DRESSLER, G. R. Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. **Journal of the American Society of Nephrology**. v.16, n.12, p.3527-34, 2005.

KIRIK D, et al. Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States**, v.100, n.5, p.2884-2889, 2003.

KLIMANSKAYA, I. et al. Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. **Nature Protocols** , v. 2, n.8, p.1963-1972, 2007.

KO, G. J. et al. Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v.23, n.3, p.842-52, 2008.

KOLAMBKAR, Y.M. et al. Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. **Journal of Molecular Histology**, v. 38, n.5, p. 405–413, 2007.

KRAMPERA, M. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen- specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, v. 101, n.9, p. 3722–3729, 2003.

KUAN, D.L. Applications of mesenchymal stem cells: an updated review. **Chang Gung Medical Journal**, v. 31, n.3, p. 228-36, 2008.

KUDRYAVTSEV, Y. V. et al. Morphological changes in the kidneys of rats with postischemic acute renal failure after intrarenal administration of fetal mesenchymal stem cells from human bone marrow. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.147, n.1, p.113-9, 2009.

KUNTER, U. et al. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. **Journal of American Society of Nephrology**, v.18, n.6, p.1754–64, 2007.

LANGE, C.; TOGEL, F. ITTRICH, H. et al. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion- induced acute renal failure in rats. **Kidney International**, v.68, n.4, p.1613–1617, 2005.

LE BLANC, K. et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. **Scandinavian Journal of Immunology**, n. 57, p. 11-20, 2003.

LEE, P.H. et al. Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v.83, n.5, p.723-30, 2008.

- LEE, S. R. et al. Repeated administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improved the protective effects on a remnant kidney model. **Renal Failure**, v.32, n.7, p.840-8, 2010.
- LI, L. et al. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury. **Journal of Immunology**, v.178, n.9, p.5899-911, 2007.
- LI, L. et al. Renal and bone marrow cells fuse after renal ischemic injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.18, n.12, p.3067-77, 2007.
- LIN, F. et al. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 14, p. 1188-1199, 2003.
- LIN, F.; MORAN, A.; IGARASHI, P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n.7, p. 1756–64, 2005.
- LIU, Y. Hepatocyte growth factor and the kidney. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.11, n.1, p.23–30, 2002.
- LIU, K. D.; BRAKEMAN P. R. Renal repair and recovery. **Critical Care Medicine**, v.36, suppl.4, p.187–192, 2008.
- LIU, Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 21, n.2, p. 212-222, 2010.
- LO, B.; PARHAM, L. Ethical issues in stem cell research. **Endocrinology Review**, v.30, n.3, p. 204-213, 2009.
- LUSIS, M. et al. Isolation of clonogenic, long-term self renewing embryonic renal stem cells. **Stem Cell Research**. v.5, n.1, p.23-39, 2010.
- MAESHIMA, A.; YAMASHITA, S.; NOJIMA, Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n.12, p. 3138–46, 2003.
- MA, Y.Y.; et al. Transplantation of endothelial progenitor cells alleviates renal interstitial fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction. **Life Sciences**, v. 86, n.21, p. 798-807, 2011.

MEYERROSE, T. E. et al. Lentiviral-transduced human mesenchymal stem cells persistently express therapeutic levels of enzyme in a xenotransplantation model of human disease. **Stem Cells**, v.26, n. 7, p.1713-1722, 2008.

MESCHER, E. J. Ontogeny of tracheal fluid, pulmonary surfactant, and plasma corticoids in the fetal lamb. **Journal of Applied Physiology**, v.39, n.6, p.1017-21, 1975.

MESCHER, A. L.; NEFF, A. W. Regenerative capacity and the developing immune system. **Advances in Biochemical Engineer/ Biotechnology**, v.93, p.39–66, 2005.

MILLER, S.B. et al. Hepatocyte growth factor accelerates recovery from acute ischemic renal injury in rats. **American Journal of Physiology**, v. 266, n.2, p. F129-34, 1994.

MITCHELL, K.E. et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. **Stem Cells**, v. 21, n.1, p. 50-60, 2003.

MITKA, M. Amniotic cells show promise for fetal tissue engineering. **Journal of the American Medical Association**, v. 286, n.17, p. 2083, 2001.

MIZUI, M. et al. Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity. **Kidney International**, v. 65, n.6, p. 2041-53, 2004.

MIZUNO, S. et al Recombinant human hepatocyte growth factor (HGF), but not rat HGF, elicits glomerular injury and albuminuria in normal rats via an immune complex-dependent mechanism. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 38, n. 3, p. 192–201, 2011.

MIZUGUCHI, H. T. et al. (2005). "Fiber-modified adenovirus vectors mediate efficient gene transfer into undifferentiated and adipogenic-differentiated human mesenchymal stem cells." **Biochem Biophys Res Commun** 332(4): 1101-1106.

MIZUNO, S. et al. Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.9, p.1827-34, 1998.

MIZUNO, S. et al. Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta 1 in renal fibrosis in mice. **Kidney International**, v.57, n.3, p.937-48, 2000.

MORIGI, M. et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 15, n. 7, p. 1794-1804, 2004.

MORIGI, M. et al. The regenerative potential of stem cells in acute renal failure. **Cell Transplantation**, v.15, Suppl 1, p.111-7, 2006.

MORIGI, M. et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. **Stem Cells**, v. 26, n.8, p.2075-82, 2008.

MULLER, F. et al. Amniotic fluid digestive enzymes: diagnostic value in fetal gastrointestinal obstructions. **Prenatal Diagnosis**, v. 14, n.10, p.973-979, 1994.

MUSCHLER, G. F.; NAKAMOTO, C.; GRIFFITH, L. G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v.86-A, n.7, p.1541-58, 2004.

NALDINI, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, v.272, n.5259, p.263-267, 1996.

NAUTA AJ, FIBBE WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v.110, n.10, p.3499–506, 2007.

NIGAM, S.; LIEBERTHAL, W. Acute renal failure. III. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. **American Journal Physiology - Renal Physiology**, v.279, n.1, p.F3-F11, 2000.

NIWA, H. et al. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics**, v. 24, n.4, p.372-376, 2000.

OH, J. Y. et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. **Stem Cells**, v.26, n.4, p.1047-55, 2008.

OHMICHII, H.; MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. In vivo mitogenic action of HGF on lung epithelial cells: pulmotrophic role in lung regeneration. **American Journal of Physiology**, v.270, n.6, p.1031-9, 1996.

OLVER, R. E.; STRANG, L. B. Ion fluxes across the pulmonary epithelium and the secretion of lung liquid in the foetal lamb. **Journal of Physiology**, v.241, n.2, p.327-357, 1974.

PAROLINI, O. et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 300-311, 2008.

PLENICEANU, O.; HARARI-STEINBERG, O.; DEKEL, B. Concise review: Kidney stem/progenitor cells: differentiate, sort out, or reprogram? **Stem Cells**, v.28, n.9, p.1649-60, 2010.

PLOTNIKOV, E. Y. et al. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.12, n.5A, p.1622-31, 2008.

PATSCHAN, D.; PATSCHAN S, MÜLLER GA. Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury. **Journal of Transplantation**, v.2012, id.764154, p.1-7, 2012.

PERIN, L. et al. Protective effect of human amniotic fluid stem cells in an immunodeficient mouse model of acute tubular necrosis. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. 1-16, 2010.

PERIN, L. et al. Renal differentiation of amniotic fluid stem cells. **Cell Proliferation**, v. 40, p. 936-948, 2007.

PORT, F. K.; FENTON, S. S. A.; MAZZUCHI, N. ESRD throughout the world: morbidity, mortality and quality of life. **Kidney International**, v. 57, p. S1-2, 2000.

PESCE, M.; SCHOLER, H. R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. **Stem Cells** , v.19, n.4, p. 271-278, 2001.

PERMTHAI, T. et al. A novel method to derive amniotic fluid stem cells for therapeutic purposes. **BMC Cell Biol**, v. 11, p. 79. 2010.

POCHAMPALLY, R. R. et al. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. **Blood** 103(5): 1647-1652. (2004).

PRUSA, A.R.; HENGSTSCHLA, G.E.R.M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. **Medical Science Monitor**, v. 8, p. 253–257, 2002.

PRUSA, A.R. et al. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? **Human Reproduction**, v. 18, p. 1489–1493, 2003.

RASMUSSEN I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v.312, n.12, p.2169–2179, 2006.

REBELATTO, C. K. et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology & Medicine**, v.233, n.7, p.901-13, 2008.

ROMAGNANI, P. Toward the identification of a "renopietic system"? **Stem Cells**, v.27, n.9, p.2247-53, 2009.

ROUBELAKIS, M. G. et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells Development**. v.16, n.6, p.931-52, 2007.

ROUBELAKIS, M. G. et al. In vitro and in vivo properties of distinct populations of amniotic fluid mesenchymal progenitor cells. **Journal of Cell and Molecular Medicine**, v. 15, n.9, p.1896-1913, 2011.

SACKSTEIN, R. et al. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. **Nature Medicine**, v.14, n.2, p.181-7, 2008.

SÁENZ-MORALES, D. et al. Requirements for proximal tubule epithelial cell detachment in response to ischemia: role of oxidative stress. **Experimental Cell Research**, v.312, n.19, p. 3711–27, 2006.

SAGRINATI, C. et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 17, n. 9, p.2443–2456, 2006.

SCHREPFER, S. et al. Stem cell transplantation: the lung barrier. **Transplantation Proceedings**, v.39, n.2, p.573-6, 2007.

SCHRIJVERS, B. F.; FLYVBJERG, A.; DE VRIESE, A.S. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. **Kidney International**, v.65, n.6, p.2003-17, 2004.

STAGG, J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. **Tissue Antigens**, v. 69, n.1, p.1–9, 2007.

SEMEDO, P. et al. Mesenchymal stem cells ameliorate tissue damages triggered by renal ischemia and reperfusion injury. **Transplantation Proceedings**, v.39, 2, p.421-3, 2007.

SEMEDO, P. et al. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. **Stem Cells**, v.27, n.12, p.3063-73, 2009.

SESSAREGO, N. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. **Haematologica**, v. 93, p. 339–346, 2008.

SIEGEL, N., M. Rosner, et al. Stem cells in amniotic fluid as new tools to study human genetic diseases. **Stem Cell Review**. V. 3, n.4, p.256-264, 2007.

SINHA, R. et al. Ten-year follow-up of children after acute renal failure from a developing country. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n.3, p. 829-833, 2009.

STENDERUP K, et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone**, v.33, n.6, p.919-926, 2003.

STOCUM, D. L. (2001). Stem cells in regenerative biology and medicine. **Wound Repair Regen** 9(6): 429-442.

STREUBEL, B. In vitro transformation of amniotic cells to muscle cells--background and outlook. **Wien Med Wochenschr**, v.146, n.9-10, p.216-7, 1996.

SUPP, D.M.; BOYCE, S.T. Overexpression of VEGF accelerates early vascularization and improves healing of genetically modified cultured skin substitute. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, v. 23, n.14, p. 10-20, 2002.

SUZUMURA, K.; et al. Adeno-associated virus vector-mediated production of hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis in mice. **Hepatology International**, v. 2, n. 1, p. 80-88, 2008.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n.4, p. 663- 676, 2006.

TAUB, P.J. et al. Locally administered vascular endothelial growthfactor cDNA increases survival of ischaemic experimental skin flaps. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 102, n.6, p. 2033-9, 1998.

THURMAN, J. M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. **Clinical Immunology**, v.123, n.1, p.7–13, 2007.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n.5391, p.1145-1147, 1998.

TÖGEL, F.; et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation independent mechanisms. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 289, n.1, p. F31-F42, 2005.

TÖGEL, F. et al. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. **American Journal of Physiology- Renal Physiology**, v.292, n.5, p.F1626-35, 2007.

TÖGEL, F. et al. Westenfelder C. Bioluminescence imaging to monitor the in vivo distribution of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury. **American Journal of Physiology- Renal Physiology**, v.295, n.1, p.315-21, 2008.

TÖGEL, F. et al. VEGF is a mediator of the renoprotective effects of multipotent marrow stromal cells in acute kidney injury. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.13, n.8B, p.2109-14, 2009.

TÖGEL, F. et al. Autologous and allogeneic marrow stromal cells are safe and effective for the treatment of acute kidney injury. **Stem Cells and Development**. v.18, n.3, p.475-85, 2009.

TOMA, C. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. **Circulation**, v.105, n.1, p.93-8, 2002.

TORRICELLI, F. et al. Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v. 98, n.2, p. 119–126, 1993.

TSAI, M. S. et al. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. **Biology of Reproduction**, v.74, n.3, p.545-551, 2006.

TSAI, M. S. et al. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. **Human Reproduction**, v.19, n.6, p.1450-1456, 2004.

TSANGARIS, G. et al. The amniotic fluid cell proteome. **Electrophoresis**, v.26, n.6, p.1168-1173, 2005.

VALLI, A., M. Rosner, et al. Embryoid body formation of human amniotic fluid stem cells depends on mTOR. **Oncogene**, v. 29, n.7, p. 966-977, 2010.

VAN, E. S. A.; et al. Effect of warm ischemia time and HLA(A and B) matching on renal cadaveric graft survival and rejection episodes. **Transplantation**, v. 36, n.3, p. 255-258, 1983.

VARGAS, G. A.; HOEFLICH, A.; JEHLE, P. M. Hepatocyte growth factor in renal failure: promise and reality. **Kidney International**, v. 57, n.4, p.1426-1436, 2000.

VIJAYAN, A. et al. Hepatocyte Growth Factor Inhibits Apoptosis After Ischemic Renal Injury in Rats. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 38, n. 2, p 274-278, 2001.

VILLANUEVA, S.; CESPEDES, C.; VIO, C.P. Ischemic acute renal failure induces the expression of a wide range of nephrogenic proteins. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n.4, p. R861-70, 2006.

VOGETSEDER, A. et al. Tubular cell proliferation in the healthy rat kidney. **Histochemistry and Cell Biology**, v.124, n.2, p.97-104, 2005.

YANG, J.; DAI, C.; LIU, Y. Systemic administration of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal fibrosis in mice. **Gene Therapy**, v. 8, n.19, p. 1470-9, 2001.

YEN, B.L. et al. Isolation of multipotent cells from human term placenta. **Stem Cells**, v. 23, n.1, p. 3-9, 2005.

XUE, J. L. et al. Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.17, n.4, p.1135-42, 2006.

YO, Y.; et al. Potential role of hepatocyte grow factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells. **Kidney International**, v. 54, n.4, p. 1128-1138, 1998.

YUAN, L. et al. VEGF-modified human embryonic mesenchymal stem cell implantation enhances protection against cisplatin-induced acute kidney injury. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 300, n.1, p. F207-F218, 2011.

YUE, Y. et al. Construction of hepatocyte growth factor gene recombinant adenovirus vector and its expression in rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Journal of Nanjing Medical University**, v. 22, n. 2, p. 81-86, 2008.

WAIKAR, S. S; LIU, K. D.; CHERTOW, G. M. Diagnosis, epidemiology and outcomes of acute kidney injury. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v.3, n.3, p.844-61, 2008.

WALCZAK, P. et al. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. **Stroke**, v.39, n.5, p.1569-74, 2008.

WANG, P.H. et al. Administration of neural precursor cells ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. **Nephron Experimental Nephrology**, v.112, n.1, p.20-8, 2009.

WANG, X.; DAI, J. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. **Stem Cells**, v. 28, n.5, p.885-893, 2010.

WANG, H. et al. Hepatocyte growth factor-induced amelioration in renal interstitial fibrosis is associated with reduced expression of alpha-smooth muscle actin and transforming growth factor-beta1. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 48, n.5, p. 308-315, 2011.

WEISSMAN, I. L. et al. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, n., p.387-403, 2001.

WITZGALL, R. et al. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n.5, p. 2175-88, 1994.

WONG, G. K. Y.; CHIU, A. T. Gene therapy, gene targeting and induced pluripotent stem cells: Applications in monogenic disease treatment. **Biotechnology Advances**, v. 298, n.6, p. 715-724, 2010.

ZACHOS, T. A. et al. Gene-mediated osteogenic differentiation of stem cells by bone morphogenetic proteins-2 or -6. **Journal of Orthopaedic Research**, v.24, n.6, p.1279-1291, 2006.

ZHANG, Z. X. et al., NK Cells Induce Apoptosis in Tubular Epithelial Cells and Contribute to Renal Ischemia-Reperfusion Injury. **The Journal of Immunology**, v.181, n.11, p.7489-7498, 2008.

ZHUO, W. et al. Mesenchymal stem cells ameliorate ischemia-reperfusion-induced renal dysfunction by improving the antioxidant/oxidant balance in the ischemic kidney. **Urologia Internationalis**, v.86, n.2, p.191-6, 2011.

ZONTA, S. et al. Which is the most suitable and effective route of administration for mesenchymal stem cell-based immunomodulation therapy in experimental kidney transplantation: endovenous or arterial? **Transplantation Proceedings**, v.42, n.4, p.1336-40, 2010.

ZUK PA, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology Cell**, v.13, n.12, p.4279-95, 2002.

7.ANEXOS

Anexo 1- Sequenciamento do plasmídeo codificando VEGF

ATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTGGAGCCTTGCCTTGCTGCTCTACCTCCACCAT
GCCAAGTGGTCCCAGGCTGCACCCATGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAATCATCACGAAGTG
GTGAAGTTCATGGATGTCTATCAGCGCAGCTACTGCCATCCAATCGAGACCTGGTGGAC
ATCTTCCAGGAGTACCCTGATGAGATCGAGTACATCTTCAAGCCATCCTGTGTGCCCTG
ATGCGATGCGGGGGCTGCTGCAATGACGAGGGCCTGGAGTGTGTGCCCACTGAGGAGTCC
AACATCACCATGCAGATTATGCGGATCAAACCTCACCAAGGCCAGCACATAGGAGAGATG
AGCTTCCCTACAGCACAACAAATGTGAATGCAGACCAAAGAAAAGATAGAGCAAGACAAGAA
AATCCCTGTGGGCCTTGCTCAGAGCGGAGAAAAGCATTGTTTGTACAAGATCCGCAGACG
TGTAATGTTTCTGCAAAAACACAGACTCGCGTTGCAAGGCGAGGCAGCTTGAGTTAAAC
GAACGTAATTGCAGATGTGACAAGCCGAGGCGGTGA

Anexo 2- Sequenciamento do HGF

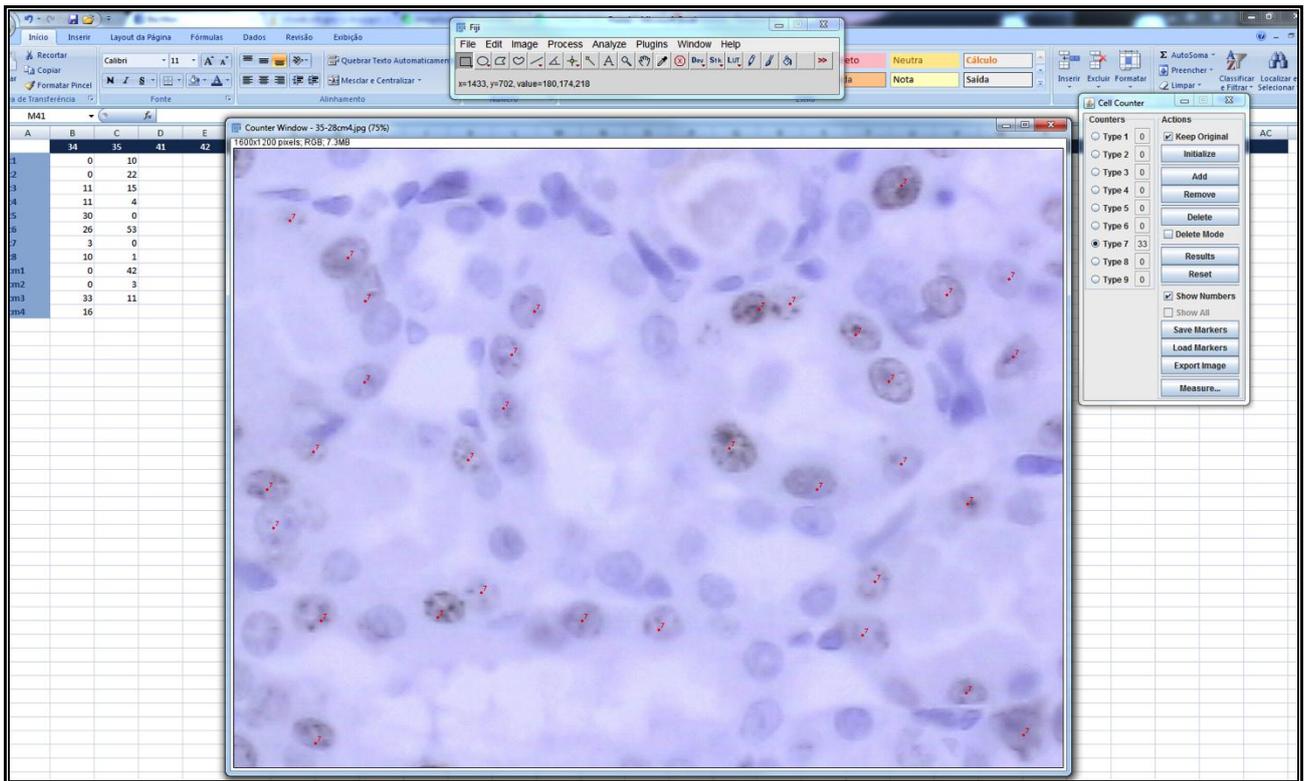
ATGTGGGTGACCAAACCTCCTGCCAGCCCTGCTGCTGCAGCATGTCCTCCTGCATCTCCTC
CTGCTCCCCATCGCCATCCCCTATGCAGAGGGACAAAGGAAAAGAAGAAATACAATTCAT
GAATTCAAAAAATCAGCAAAGACTACCCTAATCAAAATAGATCCAGCACTGAAGATAAAA
ACCAAAAAAGTGAATACTGCAGACCAATGTGCTAATAGATGTACTAGGAATAAAGGACTT
CCATTCACCTTGCAAGGCTTTTGTGTTTTGATAAAGCAAGAAAACAATGCCTCTGGTTCCCC
TTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAAAAGAATTTGGCCATGAATTTGACCTCTATGAA
AACAAAGACTACATTAGAACTGCATCATTGGTAAAGGACGCAGCTACAAGGGAACAGTA
TCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTCAGCCCTGGAGTTCATGATACCACACGAACAC
AGCTTTTTGCCTTCGAGCTATCGGGGTAAAGACCTACAGGAAACTACTGTGCAAATCCT
CGAGGGGAAGAAGGGGGACCCTGGTGTTCACAAGCAATCCAGAGGTACGCTACGAAGTC
TGTGACATTCCTCAGTGTTCAGAAGTTGAATGCATGACCTGCAATGGGGAGAGTTATCGA
GGTCTCATGGATCATAACAGAAATCAGGCAAGATTTGTGACGCTGGGATCATCAGACACCA
CACCGGCACAAATTCCTTGCCGAAAAGATATCCCGACAAGGGCTTTGATGATAATTATTGC
CGCAATCCCGATGGCCAGCCGAGGCCATGGTGCTACTCTTGACCTCACACCCGCTGG
GAGTACTGTGCAATTAACAATGCGCTGACAATACTATGAATGACACTGATGTTCTTTG
GAAACAATGAATGCATCCAAGGTCAAGGAGAAGGCTACAGGGGCACTGTCAATACCATT
TGGAATGGAATTCATGTGAGCGTTGGGATTCTCAGTATCCTCACGAGCATGACATGACT
CCTGAAAATTTCAAGTGCAGGACCTACGAGAAAATTACTGCCGAAATCCAGATGGGTCT
GAATCACCTGGTGTGTTTACCACATGATCCAACATCCGAGTTGGCTACTGCTCCCAAATT
CCAACTGTGATATGTCACATGGACAAGATTGTTATCGTGGGAATGGCAAAAATTATATG
GGCAACTTATCCCAAACAAGATCTGGACTAACATGTTCAATGTGGGACAAGAACATGGAA
GACTTACATCGTCATATCTTCTGCGGAAACCAGATGCAAGTAAGCTGAATGAGAATTACTGC
CGAAATCCAGATGATGATGCTCATGGACCCTGGTGCTACACGGGAAATCCACTCATTCT
TGGGATTATTGCCCTATTTCTCGTTGTGAAGGTGATACCACACCTACAATAGTCAATTTA
GACCATCCCGTAATATCTTGTGCCAAAACGAAACAATTGCGAGTTGTAAATGGGATTCCA
ACACGAACAAACATAGGATGGATGGTTAGTTTGAGATACAGAAATAAACATATCTGCGGA
GGATCATTGATAAAGGAGAGTTGGGTTCTTACTGCACGACAGTGTTCCTTCTCGAGAC
TTGAAAGATTATGAAGCTTGGCTTGGAAATTCATGATGTCCACGGAAGAGGAGATGAGAAA
TGCAAACAGGTTCTCAATGTTTCCAGCTGGTATATGGCCCTGAAGGATCAGATCTGGTT
TTAATGAAGCTTGCAGGCCTGCTGTCTGCTGGATGATTTTGTAGTACGATTGATTTACCT
AATTATGGATGCACAATTCCTGAAAAGACCAGTTGCAGTGTATGCTGGCTGGGGCTACACT
GGATTGATCAACTATGATGGCCTATTACGAGTGGCACATCTCTATATAATGGGAAATGAG
AATGCAGCCAGCATCATCGAGGGAAGGTGACTCTGAATGAGTCTGAAATATGTGCTGGG
GCTGAAAAGATTGGATCAGGACCATGTGAGGGGGATTATGGTGGCCCACTTGTGTTGTGAG
CAACATAAAATGAGAATGGTTCTTGGTGTGATTGTTCTGCTGGTGGATGTGCCATTCCA
AATCGTCCTGGTATTTTTGTCCGAGTAGCATATTATGCAAAATGGATACACAAAATTATT
TTAACATATAAGGTACCACAGTCATAG

ANEXO 3- Escores de lesão avaliados em cortes histológicos renais corados por H&E após 48 horas de isquemia e reperfusão renal.

Rato	Grupo	DT	CH	NT	IMI	MIT
34	AFSC	2	2,5	1,5	0	1-5\HPF
35	AFSC	1,5	0,5	1	0,5	1-3\HPF
41	AFSC	1,5	3	3	0	1-5\HPF
42	AFSC	0,5	2	1,5	0	1-3\HPF
51	AFSC	0,5	1,5	2	0	1-2\HPF
52	VEGF	0,5	4,5	4	0	1-3\HPF
53	VEGF	0	4	4	0,5	1\HPF
54	VEGF	1,5	4,5	2,5	1	1-3\HPF
57	Control	2	4	4	2	1-4\HPF
60	HGF	0,5	4	4	1,5	1-3\HPF
61	Control	1,5	2,5	2	0	1-3\HPF
62	Control	1,5	5	1,5	0	1-2\HPF
63	Control	2	4,5	2	1	1-3\HPF
64	HGF	1	4,5	2	0,5	1-9\HPF
65	HGF+VEGF	1	2	1	2,5	1-2\HPF
66	HGF+VEGF	2	2	1	0,5	1-2\HPF
67	HGF	3	5	3,5	2,5	1-4\HPF
68	HGF	2	3,5	3	0,5	1\HPF
69	HGF	1,5	2,5	1	0	1\HPF
70	VEGF	1	2	1,5	2	1-3\HPF
71	VEGF	2	3	2,5	0,5	1-2\HPF
72	HGF+VEGF	2,5	4	3	2	1-3\HPF
73	HGF+VEGF	2,5	2	1	1,5	1-4\HPF
74	HGF+VEGF	2,5	4	3	1,5	1-3\HPF
75	Control	1,5	5	3,5	2,5	1-3\HPF
76	sham	0	0	0	0	0
77	sham	0	0	0	0	0
78	sham	0	0	0	0	0

DT: dilatação tubular; NT: necrose tubular; CH: cilindros hialinos; IMI: infiltrado mononuclear intersticial; MIT: mitoses.

ANEXO 2 – Imagem da análise morfométrica para quantificação de células positivas pra KI-67. Observar que as células já contadas ficam marcadas para que não seja duplamente quantificada.



ANEXO 3 - Escores de lesão avaliados em cortes histológicos renais corados por H&E após dois meses de lesão por isquemia e reperfusão renal.

Nº rato	DT	NT	CH	IMI	PFI	PFSC	ECG	AG
19	0	0	0	0	0	0,2	0	0
20	3*	0	0	3,5	3	2	0,5	0,2
21	2*	0	0,2	3	3	2	0,5	0,5
22	0,5	0	0,2	0,5	1	1	0,5	0,5
23	1*	0	0	1,5	2	0,5	0,5	0,5
24	0,5*	0	0,2	1	0,5	0	0,5	0,5
25	0,5*	0	0	1,5	1	0,5	0,5	0,2
26	0,5*	0	0	1	0,5	0	0,2	0,2
27	1,5*	0	0	2,5	2	0,5	0,5	0,2
28	1,5*	0	0	1,5	1,5	1	1	1
29	1,5*	0	1	3,5	4	3,5	2	1,5
30	1,5*	0	0,5	3	3,5	3,5	1	0,5
31	1,5*	0	0,2	3,5	4	4	1	0,5
32	0,8	0	0	1	1,5	2	1	0,5
33	1	0	0	2,5	2,5	0,5	1,5	0,8
36	1*	0	0	2,5	1,5	3	1	0,5
38	1	0	0	1,5	2,5	0,5	0,5	1
39	3*	0	0	0,5	0,5	0,5	1	0,5
43	1,5*	0	0	3	4	4	1,5	1
44	2*	0	1,5	3,5	3,5	2	1,5	1
45	1,5*	0	0,2	3,5	3,5	2,5	2	1,5
46	1,5*	0	0,5	3,5	4	4,5	2	1
48	2*	0	0,2	4	3	3	1	0,5
49	1,5*	0	0	2,5	3,5	4	0,2	0,2
50	2*	0	0,2	3,5	2,5	3	0,5	0,2
58	4,5*	0	2	5	5	5	2	1
Sham 1	0	0	0	0	0	0	0	0
Sham 2								
Sham 3								

DT: dilatação tubular; NT: necrose tubular; CH: cilindros hialinos; IMI: infiltrado mononuclear intersticial; PFI: proliferação fibrosa interna; PFSC: proliferação fibrosa subcapsular; ECG: espessamento da cápsula glomerular; AT: atrofia glomerular. * indica dilatação acentuada dos túbulos (hidronefrose).

ANEXO 4- Imagem da análise morfométrica para Tricrômico de Masson. Mensuração da área de fibrose.

