



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Cinthia Dias

**Efeito das Células-Tronco Pluripotentes
Induzidas (iPS) no Tratamento da
Insuficiência Renal Crônica Experimental**

**São José do Rio Preto
2015**

Cinthia Dias

**Efeito das Células-Tronco Pluripotentes
Induzidas (iPS) no Tratamento da
Insuficiência Renal Crônica Experimental**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Abbud Filho

Co-orientadora: Prof^a Dra. Heloisa Cristina Caldas

São José do Rio Preto
2015

Dias, Cinthia

Efeito das células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) no tratamento da insuficiência renal crônica experimental. São José do Rio Preto, 2015.

59p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Mário Abbud Filho

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Heloisa Cristina Caldas

1. Insuficiência renal crônica; 2. Células-tronco; 3. Terapia celular; 4. Células-tronco pluripotentes induzida;

Cinthia Dias

**Efeito das Células-Tronco Pluripotentes
Induzidas (iPS) no Tratamento da
Insuficiência Renal Crônica Experimental**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Mário Abbud Filho

1º Examinador: _____

2º Examinador: _____

Suplentes: _____

São José do Rio Preto, _____ 2015

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	01
Objetivos.....	11
2. Materiais e Métodos.....	12
3. Resultados.....	29
4. Discussão.....	43
5. Conclusão.....	48
6. Referências Bibliográficas.....	50
7. Anexos.....	58
Anexo 1. Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)	59

*A minha família,
Meus avós, pais e irmãos.*

*Em especial, aos meus avós,
Por todo amor incondicional,
Pelos ensinamentos, confiança e paz.
Por me transmitirem toda coragem e tranquilidade
E acalanto ao meu coração nos momentos de desespero
Dizendo que tudo sempre vai dar certo
E que as coisas acontecem sempre da melhor forma
Que poderiam acontecer
E eles estavam certos..!*

Agradecimentos

A Deus,

Em primeiríssimo lugar,

Pela oportunidade da vida na Terra,

Por tudo que vivi e conquistei até este momento presente.

Pois sem a vontade D'Ele nada me seria permitido.

Agradeço a Deus por todas as pessoas que ele me fez cruzar os caminhos e delas levar o melhor comigo e também a tentativa em deixar o melhor de mim.

Agradeço ao meu Senhor e meu Deus, por minha saúde,

Minha paz, minhas alegrias e tristezas, sucessos e insucessos!

Tenho somente a agradecer por tudo!

Agradeço a meus pais, que sempre ofereceram o melhor que puderam me dar, comemoraram comigo a cada conquista e me deram força e suporte quando às vezes o desânimo me abateu e por estarem ao meu lado em todos os caminhos que eu escolhi trilhar. Obrigada por todo amor incondicional!

A minha grande família, e amigos por todo apoio, por entenderem minha ausência nos momentos em que não pude estar presente. Por estarem sempre me apoiando em todas as minhas escolhas e fases da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Abbud Filho

Obrigada por abrir as portas do seu laboratório e me conceder um voto de confiança para que eu pudesse aprender um pouco mais, presenciando seu profissionalismo e sua excelência em pesquisa. Agradeço por compartilhar generosamente comigo seus amplos conhecimentos, contribuindo para meu crescimento profissional. Sincera admiração, respeito e consideração.

À minha co-orientadora Dra. Heloisa Cristina Caldas

Agradeço por me receber carinhosamente no laboratório e pela confiança depositada em mim. Obrigada pela sua presença constante, auxílio, pelo apoio, estímulo e orientação em todos os momentos. Agradeço por dividir comigo sua extensa experiência, seus conhecimentos, me oferecendo a oportunidade de crescer profissionalmente. Obrigada por sua amizade, carinho e dedicação. Expresso aqui minha gratidão, admiração e respeito.

A todos os amigos, integrantes da família LITEX - Laboratório de Imunologia e Transplante Experimental

Às minhas queridas amigas Camila Montoro Mazeti Felício, Natália Alves Fiorilli, Priscila Mata Camargo, Brenda Caroline Violin, Greiciane M. da Silva Florim, Camila Ravazzi, Julio Cesar Razera, Glória Elisa Florido Mendes, pela amizade, pelos melhores momentos de convívio, companheirismo, colaboração e alegrias.

Agradecimentos à Prof.^a Dra Maria Alice S. Baptista,

Pela valiosa contribuição neste trabalho, com a realização das análises histológicas. Obrigada pela disponibilidade e atenção de sempre.

Agradecimentos à Prof.^a Dra. Ida Maria Maximina Fernandes,

Obrigada pela preciosa participação neste projeto, realizando as cirurgias. Agradeço a atenção e colaboração e disponibilidade de sempre.

Agradecimentos à Prof.^a Dra. Rosa Sayoko Kawasaki-Oyama,

Pela valiosa contribuição e transmissão de seus amplos conhecimentos principalmente em cultura celular, obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e atenção de sempre!

Agradecimentos ao Prof. Dr. Fernando H. Lojudice,

Obrigada pela valiosa e inovadora contribuição para realização deste trabalho e pela disponibilidade e atenção de sempre!

Agradecimentos às minhas queridas amigas Stéphanie Piacenti, Claudia Regina dos Santos, Samia Frahia e Rafael F. Fernandes pela verdadeira amizade e pelos momentos de alegria e ensinamentos compartilhados durante essa caminhada. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile, Diretor-adjunto do Programa de Pós-graduação da FAMERP

Pelo empreendedorismo e dinâmica contagiante, promotora do desenvolvimento deste curso.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Agradeço a todos os funcionários desta Instituição, pela atenção e disponibilidade. Pelo incentivo e apoio para o desenvolvimento deste projeto.

Aos nossos laboratórios vizinhos e todos os funcionários do bloco-U6, pelo harmonioso e alegre convívio diário.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo- (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (CNPq).

Pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro e grande contribuição para realização deste projeto.

"Por isso não tema, pois estou com você;

Não tenha medo, pois sou o seu Deus.

Eu o fortalecerei e o ajudarei;

*Eu o segurarei com a minha mão direita vitoriosa". **Isaias 41:10***

"... Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro,

depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde.

*E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem do presente
de forma que acabam por não viver nem no presente nem no futuro.*

E vivem como se nunca fossem morrer...

e morrem como se nunca tivessem vivido. "

Dalai Lama

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de Primers para transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase.....	17
Tabela 2. Divisão dos grupos experimentais.....	19
Tabela 3. Descrição dos anticorpos utilizados na técnica de imunohistoquímica..	25
Tabela 4. Função renal parâmetros avaliados no final do estudo (60 dias).....	34
Tabela 5. Alterações histológicas e o efeito do tratamento com as CTM e iPS em animais com nefrectomia 5/6.....	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema mostrando a geração de células pluripotentes induzidas a partir de células somáticas..... 06
- Figura 2.** Ação das células-tronco mesenquimais (CTM) no processo de fibrose renal. 1. Lesão renal; 2. Fibroblastos residentes nas paredes dos túbulos migram para o local da lesão; 3. Proliferação de fibroblastos com aumento da matriz extracelular (ME); 4. Após lesão renal a medula óssea (MO) e a transição epitélio-mesenquimal (TEM), associados ao TGF- β aumentam o número de fibroblastos levando a fibrose; 5. Células-tronco migram para o local da lesão através da liberação de fatores de crescimento e citocinas reduzem a ação pró-fibróticas do TGF- β bloqueando a TEM e diminuindo a fibrose renal..... 09
- Figura 3.** Caracterização das células-tronco pluripotentes induzidas (iPS). (A): Morfologia das colônias de células iPS. (B): coloração de imunofluorescência de ratos células-tronco pluripotentes induzidas para a expressão de marcadores de pluripotência o OCT-4 (painéis superiores, barra de escala de 400 μ m) e SOX-17 (painéis inferiores, barra de escala 1000 μ m) e sobreposição com a coloração controle do núcleo com DAPI (Sigma). (C): a análise de RT-PCR da expressão do gene em células indiferenciadas RIPS..... 31
- Figura 4.** Método de Nefrectomia (CRF) 5/6. (A):Administração intraperitoneal de anestesia nos animais. (B):Laparotomia. (C): Localização da artéria renal esquerda. (D):Isoalmento da artéria renal esquerda (50x). (E):Ligadura de dois ramos da artéria renal esquerda. (F):Observação da área infartada e área renal remanescente e infusão das CTMs ou iPS no cortex renal..... 32
- Figura 5.** Imagens macroscópicas e microscópicas mostraram “tumores” formados a partir da infusão as células iPS no parênquima renal após 60 dias. (1) (a) Rim apresentando tamanho e aparência normal; (b e c) mascroscopia mostra a superfície com tumores 36

renais; (2) a) Corte histológico de rim com tumor mostrando a diferenciação de células de tumor em cartilagem (Ampliação:100x; Coloração Tricomo de Masson); b) Intensa proliferação de células estromais (Coloração Tricomo de Masson - Ampliação:100x); c) Células localizadas no estroma formando alguns túbulos (seta) (Coloração Tricomo de Masson - Ampliação: 200x); d) Células tumorais (♥) (Coloração Tricomo de Masson - Ampliação: 400x).

- Figura 6.** Imagens representativas de células CD68 (macrófagos), α -SMA, PCNA, TGF- β e VEGF no córtex renal de animais com IRC tratados com CTM e iPS 60 dias após o tratamento. (Ampliação: 400x)..... 38
- Figura 7.** Gráficos representativas de células CD68 (macrófagos), α -SMA, PCNA, TGF- β e VEGF no córtex renal de animais com IRC tratados com CTMs e iPS 60 dias o tratamento. *P<0,05 vs CRF.... 39
- Figura 8.** Expressão das citocinas no tecido renal. Expressão dos genes em rins de animais tratados (CTM e iPS) e não tratados (CRF). O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno da reação. Dados expressos como média de $2^{-\Delta\Delta CT} \pm DP$. (*P<0,05 vs. CTM e iPS; **P<0,05 vs. iPS)..... 41
- Figura 9.** Estudo do quimerismo das células iPS, por PCR em tempo real para a detecção do gene SRY. A presença de DNA do rato macho doador foi localizados nas fêmeas receptoras das células iPS. A curva **A**, corresponde a um controle positivo de DNA de rato macho, as curvas **B-E** representam a presença do gene SRY em fêmeas receptoras após a infusão de células iPS e que desenvolveram tumores..... 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ΔCrP	- Variação da creatinina plasmática
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$	- Método dois elevado a menos delta delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$)
$\alpha\text{-SMA}$	- Actina de músculo liso alfa
α	- Alfa
AT	- Atrofia tubular
β	- Beta
CD68	- Cluster de diferenciação 68
CT	- Células-tronco
Ct	- Limiar do ciclo
cDNA	- DNA obtido por transcrição reversa a partir do RNA
CTE	- Células-tronco embrionárias
CTH	- Células-tronco hematopoiéticas
CTM	- Células-tronco mesenquimais
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
ClCr	- Clearance de creatinina
CrP	- Creatinina plasmática
EG	- Esclerose glomerular
FAMERP	- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FI	- Fibrose intersticial
FT	- Fatores de Transcrição
HGF	- Fator de crescimento de hepatócitos
IGF	- Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	- Infiltração linfocítica intersticial
IL-10	- Interleucina 10

IL-6	- Interleucina 6
iPS	- Células pluripotentes induzidas
IRC	- Insuficiência Renal Crônica
M	- Molar
ME	- Matriz extracelular
MEF's	- Meio células embrionárias fetais
mg/dL	- Miligrama por decilitro
MO	- Medula óssea
NX 5/6	- Nefrectomia 5/6
PCNA	- Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR-RT	- Reação em cadeia da polimerase em tempo real
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
PT24hs	- Proteinúria de 24 horas
SBF	- Soro fetal bovino
SRY	- <i>Sex-determining region Y</i>
TDCI	- Taxa de declínio do clearance de creatinina
TEM	- Transição epitélio-mesenquimal
TEndM	- Transição do endotélio-mesenquimal
TGF- β	- Fator transformador de crescimento beta
UOsm	- Osmolalidade urinária
UrP	- Ureia plasmática
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
VU	- Volume urinário

RESUMO

Introdução: A terapia com células-tronco (CT) é uma estratégia promissora para reparar ou retardar a progressão da insuficiência renal crônica (IRC). As células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) podem ser uma alternativa terapêutica, em virtude de seu potencial de diferenciação. **Objetivos:** 1) Modificar geneticamente células de fibroblastos de ratos com vetores lentivirais contendo fatores de transcrição, transformando essas células diferenciadas em iPS; 2) Avaliar o efeito das iPS e CTM na progressão da IRC experimental induzida pela nefrectomia 5/6 (CRF5/6). **Materiais e Métodos:** Os animais foram divididos conforme o tipo de terapia celular recebida (célula-tronco mesenquimal extraída da medula óssea (CTM) ou com iPS) e comparados com o grupo CRF5/6. A avaliação da função renal foi realizada no período basal e após 60 dias. Adicionalmente foi quantificada a expressão dos genes, VEGF, IL-6, TGF- β e IL-10 no tecido renal e estudada a migração das células implantadas contendo o gene SRY. O estudo imunohistoquímico avaliou a expressão de marcadores CD68, α -SMA, TGF- β , PCNA e VEGF. **Resultados:** Redução significativa foi observada na variação da creatinina ($p < 0,05$) e ureia plasmática ($p < 0,01$) dos animais tratados com CTM e uma diminuição de 33% dos níveis de creatinina plasmática nos animais tratados com células iPS, porém sem significância estatística quando comparada ao grupo controle. A proteinúria de 24 horas foi reduzida somente no grupo iPS ($p = 0,0001$) e houve melhora significativa no clearance de creatinina com ambos tratamentos ($p = 0,04$). A progressão da doença, medida pela taxa de declínio do clearance de creatinina, foi significativamente lentificada somente no grupo CTM ($p = 0,04$) e a osmolalidade urinária foi similar em ambos os grupos tratados. Houve aumento na expressão do gene TGF- β no grupo iPS quando comparado ao grupo

controle ($p=0,01$) e da expressão de VEGF nos grupos tratados com iPS e CTM ($p=0,01$). IL-6 e IL-10 mostraram níveis de expressão semelhantes em ambos os grupos tratados ($p=NS$). A análise imunohistoquímica demonstrou menor número de macrófagos e diminuição da atividade proliferativa celular (PCNA) no grupo iPS $p<0,05$. A análise histológica mostrou diminuição significativa da glomeruloesclerose em ambos grupos tratados ($p<0,01$), a atrofia tubular foi semelhante nos três grupos. A infiltração leucocitária foi reduzida em ambos os tratamentos, quando comparados ao grupo CRF. O gene SRY foi detectado em 5 de 8 (62,5%) ratos que receberam tratamento com iPS. Após 60 dias foram observadas as formações tumorais nos respectivos animais em que o gene SRY foi detectado. **Conclusões:** A terapia com CTM é eficiente para retardar a progressão da IRC. Tratamento com iPS também melhora alguns parâmetros da função renal, mas o aparecimento de formações tumorais dificulta essa avaliação e requer cuidados com esse tipo de célula.

Palavras-chave: Insuficiência renal crônica; Células pluripotentes induzidas; célula-tronco, terapia celular, células-tronco mesenquimais.

ABSTRACT

Introduction: Stem cell therapy is a promising strategy to repair or delay the progression of chronic renal failure (CRF). Induced pluripotent stem cells (iPS) can be a therapeutic alternative due to their differentiation potential. **Objectives:** 1- To modify genetically stem cells from mice's fibroblasts with lentiviral vectors containing transcription factors, transforming differentiated cells into iPS; 2- To evaluate the effect of iPS in the experimental IRC progression of IRC induced by 5/6 nephrectomy (CRF-5/6). **Materials and Methods:** The animals were divided according to the type of cell therapy received from extracted mesenchymal stem cells from bone marrow (MSC) or iPS and compared with CRF group 5/6 without treatment. Assessment of renal function was carried out during baseline and after 60 days. Additionally expression of genes, VEGF, IL-6, TGF- β and IL-10 were quantified in the kidney tissue, and also the analysis of implanted cell migration through the SRY gene. Immunohistochemical study evaluated the expression of CD68, α -SMA, TGF- β , PCNA and VEGF markers.

Results: A significant decrease was observed in creatinine variation ($p < 0.05$) and plasma urea ($p < 0.01$) in animals treated with MSC and a 33%-decrease in plasma creatinine levels of animals treated with iPS cells, although non-significant when compared to the control group. The 24-hour proteinuria was significantly reduced only in the iPS group ($p < 0.0001$). Significant improvement was observed in creatinine clearance in both treatments ($p < 0.04$). Disease progression measured by the clearance decline rate was significantly lower only in the MSC group ($p < 0.05$) and the urinary osmolality was similar in both treated groups. There was an increase in the expression of TGF- β gene in iPS group when compared to the control group ($p < 0.05$) and VEGF expression in the groups treated with iPS and MSC ($p < 0.05$). IL-6 and IL-10 showed

similar expression levels in both treated groups ($p=NS$). Immunohistochemical analysis showed fewer macrophages and decreased cell proliferative activity (PCNA) in the iPS group $p<0.05$. Histological analysis showed a significant decrease in glomerulosclerosis in both treatment groups ($p<0.01$), tubular atrophy was similar in all groups. Leukocyte infiltration was reduced in both treatments when compared to CRF group. The SRY gene was detected in 5 out of 8 (62.5%) mice that were treated with iPS. After 60 days the tumor formations were observed in animals in which SRY gene was detected.

Conclusions: MSC therapy is effective in delaying the progression of CKD. Treatment with iPS also improves some parameters of renal function but this assessment can be difficult since the onset of tumor formations; thus some care is necessary with this type of cells.

Keyword: Chronic renal failure, Induced pluripotent cells, stem cells, cell therapy, mesenchymal stem cells.

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Insuficiência renal crônica

A insuficiência renal crônica (IRC) é um importante problema de saúde pública e por essa razão a comunidade nefrológica internacional tem mobilizado esforços para tentar prevenir, diagnosticar precocemente e tentar retardar a progressão da doença. Na prática clínica os pacientes com IRC progridem para a fase terminal e necessitam da terapia renal substitutiva: a diálise e/ou transplante renal.¹⁻⁴

As principais causas da IRC são hipertensão arterial, diabetes mellitus e glomerulopatias.⁵⁻⁷ No Brasil, segundo dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia (2000-2013), cerca de 100.000 pacientes (170 pacientes por milhão de habitantes) recebem tratamento dialítico, porém o número de pessoas da população acometidas por IRC em estágios diferentes do terminal é desconhecido.⁷

Comparado ao transplante renal, o tratamento dialítico é muito mais oneroso para o orçamento governamental destinado à saúde. Consequentemente, estratégias que visam prevenir, retardar ou regenerar as lesões renais crônicas são fundamentais para tentar reduzir o impacto econômico do tratamento dialítico e as comorbidades da doença.⁸

Os mecanismos que levam à IRC são multifatoriais e a perda da função renal pode ser consequência de fatores mecânicos, imunológicos ou tóxicos. Em todos eles o mecanismo final de lesão tecidual envolve proliferação celular, liberação de citocinas inflamatórias, ativação de genes fibrogênicos, aumento na formação de colágeno e fibrose.⁹

Um dos modelos experimentais que mais tem sido utilizado para estudar a IRC é o modelo de redução cirúrgica de 5/6 da massa renal. Nesse modelo, os mecanismos

compensatórios tornam-se patológicos e contribuem para o desenvolvimento da progressão da lesão renal, simulando a IRC observada em pacientes.¹⁰⁻¹³

1.2. Células-Tronco

As Células-tronco (CT) são conhecidas pela sua capacidade de auto-renovação, proliferação e sua capacidade de diferenciação em células especializadas. Conforme sua capacidade de diferenciação as células **totipotentes** são capazes de gerar todos os tipos de tecido existentes em um organismo, inclusive os anexos embrionários (zigoto). As CT **pluripotentes**, como as embrionárias e as pluripotentes induzidas (iPS), podem originar as células dos três folhetos embrionários (mesoderme, endoderme e ectoderme), mas não são capazes de gerar tecidos extra-embrionários. As **multipotentes** são CT que apresentam capacidade de diferenciação mais limitada, não sendo capazes de se diferenciar em todos os tipos de tecidos (ex. células-tronco mesenquimais). Por fim, as CT **unipotentes** constituem as células que podem se diferenciar em apenas um tipo celular. Segundo o tecido de origem, as CT podem ser subdivididas em células-tronco embrionárias (CTE), células-tronco adultas e células-tronco pluripotentes induzidas (iPS).¹⁴⁻¹⁶

1.2.1. Células-tronco embrionárias

As células-tronco embrionárias (CTE) são células pluripotentes, obtidas a partir das células da massa interna de embriões na fase de blastocisto e caracterizam-se pela capacidade ilimitada de auto-renovação e podem se transformar em células das três linhagens germinativas: ectoderme, endoderma e mesoderme.¹⁷⁻²⁰ Além dos problemas metodológicos e técnicos relacionados ao controle da multiplicação e diferenciação das

CT embrionárias, um importante obstáculo para a utilização desse tipo celular são as questões éticas e religiosas.²¹

1.2.2. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTM) caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes, capazes de se diferenciarem e produzirem tipos celulares indispensáveis para a reparação e manutenção tecidual.^{22,23} *In vitro*, as CTMs exibem morfologia fibroblastóide, aderem ao substrato plástico, têm capacidade de auto-renovação e diferenciação em osteócitos, condrócitos e adipócitos. Essas células expressam várias moléculas características em suas membranas, entre elas CD105, CD73 e CD90 e não possuem os marcadores típicos das células da linhagem hematopoiética.^{24,25} As CTM servem como um “reservatório” para manter o crescimento e reparo dos tecidos. *In vivo*, essas células localizam-se em um microambiente (Nicho) constituído pelas CT propriamente ditas, por células progenitoras e células diferenciadas. Esse microambiente é controlado por fatores liberados na matriz extracelular, estimulação parácrina e fatores de crescimento. Vários estudos têm demonstrado a plasticidade das CTM, mas poucos ensaios clínicos ou pré-clínicos foram realizados, o que limita maior conhecimento sobre os efeitos desse tipo celular.

^{26,27}

1.2.3. Células-tronco Pluripotentes Induzidas

Células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) são originadas a partir de células adultas geneticamente modificadas e possuem propriedades semelhantes às CTE. As células iPS foram geradas pela primeira vez por Takahashi e Yamanaka, a partir de fibroblastos embrionários e adultos de camundongos.^{28,29} O processo de reprogramação

inclui a transfecção de 4 genes (OCT-4, SOX2, C-MYC E KLF4) característicos das células-tronco embrionária (CTE), que se inserem no DNA da célula adulta e reprogramam o código genético.³⁰⁻³³ Essas modificações genéticas induzem a reprogramação da célula, que regride à um estágio de célula pluripotente, exibindo morfologia, padrão de marcadores e propriedades de proliferação equivalente a uma CTE ^{34,35} (Figura 1). Além disso, elas não apresentam senescência celular após longo tempo em cultura, ao contrário dos fibroblastos de onde se originaram.³⁶

O uso de iPS confere uma vantagem em relação ao uso de CTE pois são obtidas do próprio paciente, eliminando riscos de rejeição,³⁷ mas alguns problemas ainda limitam a reprogramação das células somáticas em iPS como a baixa eficiência na reprogramação (0,1% com retrovírus), o aparecimento de colônias morfológicamente semelhantes às CTE, mas sem estarem completamente reprogramadas e a lentidão do processo de reprogramação.³⁸

A indução da diferenciação celular é mantida por um conjunto de fatores genéticos e epigenéticos como os fatores de transcrição (FT) OCT4, SOX2 E NANOG, que detêm mecanismos de auto-regulação e são dependentes de seus níveis de expressão. Os FT podem se ligar aos promotores dos outros genes, facilitando assim, a manutenção do estado de pluripotência induzindo o silenciamento dos genes exógenos por meio da metilação dos seus promotores.³⁹⁻⁴¹

Embora os fatores de Yamanaka sejam os mais utilizados, outras combinações de fatores foram também usados com sucesso, como a substituição do C-MYC e KLF-4 por NANOG e LIN28,⁴² ou apenas a substituição do fator C-MYC.⁴³

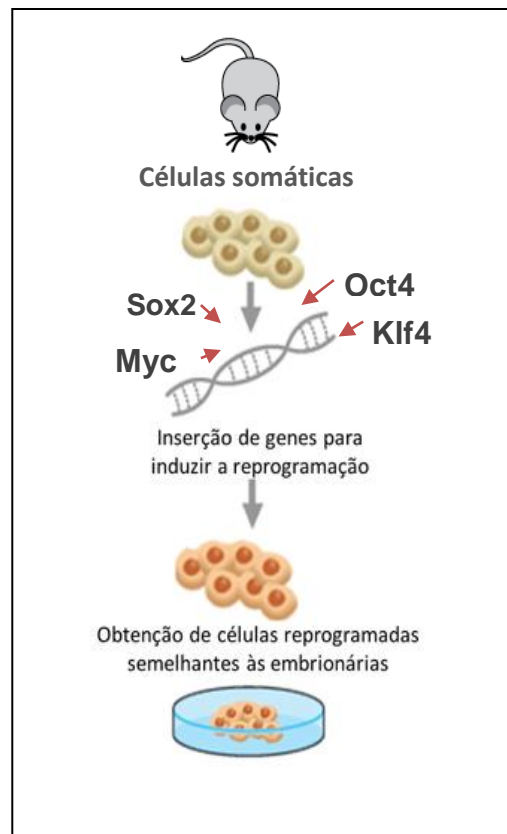


Figura 1. Esquema mostrando a geração de células pluripotentes induzidas a partir de células somáticas (adaptado de Rossant, 2007).

1.3. Mecanismos de ação das células-tronco na reparação renal

Os mecanismos usados pelas CT para regeneração tecidual, tanto renal como de outros órgãos, ainda são desconhecidos. Algumas hipóteses formuladas sobre esses mecanismos incluem: 1) *diferenciação*, processo pelo qual uma célula-tronco se diferencia em uma célula adulta de outro tecido; 2) *fusão celular*, entre as células-tronco da medula óssea com as células do órgão afetado, gerando uma célula híbrida com o fenótipo do órgão lesado; 3) *ação parácrina*, modulatória das células-tronco sobre tecido remanescente, onde as CT secretam uma grande variedade de citocinas pró e anti-inflamatórias, além de fatores de crescimento que modulam a resposta inflamatória.⁴⁴⁻⁴⁵

Além disso, as CT interagem com as células residentes dos nichos podendo induzi-las, por mecanismo parácrino, a se diferenciarem em linhagens celulares distintas, conforme o tipo de estímulo. Ainda, é possível que o papel desempenhado pelas CT na regeneração tecidual renal envolva a ação concomitante de dois ou mais desses e/ou de outros processos.⁴⁶

A fibrose túbulo-intersticial é um evento comum da IRC não sendo apenas uma resposta à lesão tubular, mas um fator determinante para a perda do néfron. O mecanismo de fibrogênese renal decorre de uma produção excessiva de componentes da matriz extracelular (ME) para auxiliar no reparo do tecido renal e da persistência da inflamação que mantém a síntese de ME elevada, agravando a formação de fibrose.⁴⁷ (Figura 2). A ME presente no processo fibrótico é produzida por células denominadas miofibroblastos que podem ser originados da medula óssea (15% - fibrócitos) ou pela proliferação local de fibroblastos intersticiais (15%), enquanto 70% origina-se de células epiteliais e endoteliais geradas pela transição epitélio-mesenquimal (TEM) e pelo processo de transição do endotélio-mesenquimal (TEndM) respectivamente.⁴⁸

A TEM renal é um fenômeno no qual as células do epitélio perdem suas características fenotípicas epiteliais e adquirem as características das células mesenquimais, e dessa forma proporcionam uma fonte renovável de miofibroblastos. A célula de origem mesenquimal tem características de fibroblastos e de células musculares lisas e são reguladas pelas moléculas TGF- β (fator transformador de crescimento beta), angiotensina II e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas).

49,50

Recentes estudos sugerem que o bloqueio da TEM e conseqüentemente da transformação em miofibroblastos pode representar um tratamento promissor para

retardar a progressão da doença renal. O papel das CTs no processo de fibrogênese renal ainda é controverso. É possível que as CTMs possam reverter o processo de fibrose gerando fatores de crescimento como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), HGF (fator de crescimento de hepatócitos) e IGF-1 (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo1). Esses fatores inibiriam as ações pró-fibróticas do TGF- β reduzindo a inflamação e dessa forma promoveriam a regeneração do tecido renal lesado (Figura 2).

51-53,10

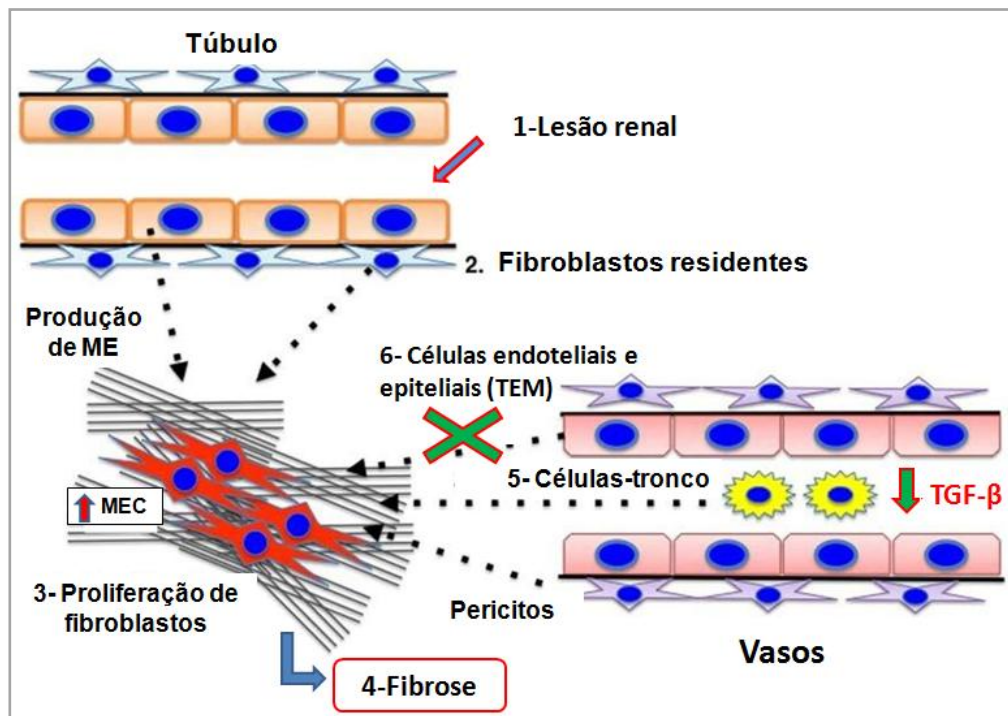


Figura 2. Ação das células-tronco mesenquimais (CTM) no processo de fibrose renal.

1. Lesão renal; 2. Fibroblastos residentes nas paredes dos túbulos migram para o local da lesão, 3. Proliferação de fibroblastos com aumento da matriz extracelular (ME), 4. após lesão renal a medula óssea (MO) e a transição epitélio-mesenquimal (TEM), associados ao TGF- β aumentam o número de fibroblastos levando a fibrose, 5. Células-tronco migram para o local da lesão através da liberação de fatores de crescimento e citocinas reduzem a ação pró-fibrótica do TGF- β bloqueando a TEM e diminuindo a fibrose renal.⁽²⁴⁾

1.4 Terapia Celular e Insuficiência renal

A maioria das doenças renais crônicas se caracteriza por uma lesão inicial, seguida da progressão dessas lesões para formação de fibrose tecidual que gradativamente substitui o parênquima renal normal.^{54,4-10}

Experimentalmente, o modelo classicamente utilizado para estudos da IRC é o de redução de 5/6 da massa renal de ratos. Nesses modelos, a lesão renal é induzida

pela retirada cirúrgica e/ou infarto de partes do parênquima renal e os animais evoluem com alterações bioquímicas e sinais clínicos semelhantes aos da IRC em humanos.^{55,56,12}

Independente da técnica usada, os autores desse modelo sugerem que os mecanismos compensatórios tornam-se patológicos e contribuem para o desenvolvimento da progressão da lesão renal. Por esse motivo, intervenções terapêuticas farmacológicas têm sido utilizadas nesses animais e esses modelos também passaram a servir para os estudos com terapia celular, com o objetivo de tentar reparar ou retardar a IRC.⁵⁷

Recentemente, demonstramos que o uso de células derivadas da medula óssea, quando implantadas no parênquima renal de ratos com IRC induzida por redução de 5/6 da massa renal, reduziu ou estabilizou significativamente a taxa de declínio da clearance da creatinina desses animais.^{4,10,23} Outros autores também demonstraram que o tratamento com CTMs, em modelo de nefrectomia 5/6, produziu efeitos benéficos e sugeriram que as CTMs poderiam ajudar a preservar a estrutura renal ou estabilizar a IRC. Esses relatos reforçaram que o uso da terapia celular pode ser uma importante arma da medicina regenerativa para reparar as lesões da IRC.^{4,13,23}

Novas opções de CT estão sendo estudadas no campo da terapia celular. Os avanços na tecnologia de reprogramação, incluindo métodos alternativos e a geração bem sucedida de células pluripotentes induzidas (iPS) a partir de vários tipos celulares, têm ocorrido desde 2006 quando Takahashi e Yamanaka descreveram pela primeira vez as iPS reprogramadas a partir de fibroblastos de camundongos. Alguns estudos têm demonstrado que as células iPS podem ser derivadas de células renais, geradas a partir de células mesangiais renais humanas e células tubulares.⁵⁸ Essas células podem se

diferenciar em linhagens de origem mesodérmica, substituir as células lesionadas e reconstruir parcialmente o rim danificado.⁵⁹ Em um estudo feito em ratos, Lee et al, demonstraram que células iPS infundidas por via intra-arterial reduziu a expressão de substâncias oxidativas, citocinas pró-inflamatórias e fatores apoptóticos no rim após o processo de isquemia-reperfusão, com melhora na sobrevivência dos animais.⁶⁰ No rim, as iPS transplantadas em regiões lesionadas podem sobreviver e expressar marcadores de células renais.^{61,62} O efeito protetor das iPS no rim podem ser mediados por fatores anti-apoptóticos, anti-inflamatórios e anti-fibrogênicos, bem como pela diferenciação dessas células em células renais específicas, mas esses efeitos benéficos ainda são controversos.^{2,63} Recentemente foi relatada a geração de células iPS a partir de células mesangiais e células tubulares obtidas em urina.⁶⁴ Assim, potencialmente as células iPS poderiam proporcionar a reparação ou regeneração do tecido renal lesado, com maior potencial terapêutico que as células-tronco adultas, embora a diferença entre as CTMs da medula óssea e as iPS ainda não tenha sido testada.⁶⁵

1.5. Objetivos

Os objetivos do estudo foram:

1. Modificar geneticamente células de fibroblastos de ratos com vetores lentivirais com os fatores de transcrição OCT-4, C-MYC, KLF-4 e SOX2, visando transformar células diferenciadas em iPS.
2. Avaliar o efeito das iPS e CTM na progressão da IRC experimental induzida pela nefrectomia

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Aspectos éticos

O presente estudo foi analisado e obteve aprovação do Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, sob Protocolo n.º 6852/2012 (Anexo1).

2.2. Extração, isolamento, cultivo e caracterização das CTM

As amostras de medula óssea foram obtidas de fêmures e tíbias de ratos machos adultos da linhagem *Wistar*. Os animais foram sacrificados por overdose de anestésico e tiveram os dois fêmures e tíbias dissecadas, eliminando-se os tecidos musculares e conjuntivos associados. Em seguida foram feitos dois cortes na região das epífises, possibilitando a entrada da agulha na cavidade medular, onde foram injetados meios de cultura D-MEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium - GibcoBRL) para retirada das células. A suspensão celular da medula óssea foi transferida para tubos de centrífuga contendo Ficoll-Paque (densidade 1.077 g/mL - Amersham Biosciences) (proporção Ficoll:meio de 1:1) e centrifugado por 30 minutos a 23°C. As células mononucleares coletadas foram lavadas duas vezes com meio incompleto. O *pellet* foi ressuspenso em meio D-MEM, suplementado com 10% SFB, 1% antibiótico/antimicótico, 1% de L-glutamina. A viabilidade das células foi determinada pelo método de exclusão pelo azul de tripan. Foram semeadas cerca de 1×10^6 células mononucleares/cm² em frasco de 25 cm² e acrescentado meio de cultura D-MEM completo. Os frascos foram mantidos em incubadoras a 37°C, com 95% de umidade e 5% de CO₂. As células mononucleares não aderentes foram removidas da cultura durante as trocas de meio, permanecendo apenas as células mesenquimais, com capacidade de aderir ao frasco. As CTM foram

reincubadas em frascos de cultura contendo meio DMEM completo e mantido nas mesmas condições anteriores.

a) Diferenciação in Vitro das CTm em adipócitos e osteócitos

Foi verificado o potencial de diferenciação em osteócitos e adipócitos das CTMs.¹ As células aderentes foram cultivadas em placas de 6 poços na densidade celular de 3×10^3 céls/mL, com meio completo por 5 dias. A seguir foi realizada a substituição do meio de cultura, por um meio condicionado, próprio para diferenciação osteogênica. O meio completo foi suplementado com β -glicero-fosfato 10 mM, 200 uM de ácido ascórbico e dexametasona 1uM (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Para o controle de diferenciação celular, foram realizados cultivos somente com meios de cultura completo. Para evidenciar a presença de cálcio nas células foi realizada a coloração de Von Kosa. Para diferenciação adipogênicas, as CTMs confluentes foram cultivadas por 2 semanas em meio DMEM suplementado SFB a 10%. A partir do 7º dia foi adicionado ao meio de cultura: indometacina (100 μ M), Dexametasona (100mM) e insulina (10 μ g/mL). As trocas de meio foram realizadas a cada 3 dias, mantendo o estímulo por 21 dias. Depois de completado o período de incubação, as células foram fixadas com formalina 1% por 15 minutos e levadas com isopropanol 60%. Posteriormente células foram incubadas por 10 minutos com Oil Red 0,2% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) para coloração. Após a Lavagem com água deionizada, os vacúolos lipídicos corados em vermelho, foram observados ao microscópio.⁶⁶

2.3. Geração de células iPS a partir de fibroblastos de pele de rato - derivação e caracterização de iPS

Os lentivírus foram produzidos através da co-transfecção em células 293T de quatro plasmídeos (VSV-G, REV, TAT e HGPM-2), juntamente com os vetores STEMCCA (OKSM ou OKS-dsRed) gentilmente cedidas por Gustavo Mostoslavsky.⁶⁷ Os sobrenadantes foram recolhidos a cada 12 horas, começando 24 horas após a transfecção e partículas virais foram concentradas por centrifugação a 21.000G durante 4 horas a 4°C. Os fibroblastos foram isolados a partir de pele de rato Wistar e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% soro fetal de vitela e antibióticos.

2.3.1. Transdução e geração das iPS

Para a transdução, 10^5 fibroblastos foram colhidas e incubadas durante 24 horas com 60µl de vírus concentrado na presença de polibreno (10µg/mL) em placas de cultura de 35mm. Quarenta e oito horas após a transdução, as células foram colhidas e semeadas em Meio Células Embrionárias Fetais (MEFs) irradiado com CT embrionárias de roedores: DMEM suplementado com 15% de SFB (ES-qualificado, Invitrogen), 2 mM de L-glutamina, 1x DMEM Aminoácidos não essenciais (NEAA), 0,1mM β-mercaptoetanol, 1,000 U/ml de Fator Inibidor da Leucemia e antibióticos. O meio foi trocado a cada dois dias até o aparecimento de colônias de iPS aproximadamente 20-25 dias. As colônias de iPS foram colhidas primeiro manualmente e depois expandido com ação da tripsina (Trypsin EDTA, Gibco, EUA).

a) Imunocitoquímica

Para a coloração intracelular, as colônias iPS foram fixadas e permeabilizadas com o Paraformaldeído 4% e 1% de Triton X-100. As amostras foram bloqueadas com BSA a 5% durante 1 hora à temperatura ambiente. As colônias de iPS foram coradas

durante a noite com anticorpo não conjugado OCT4A mAb (Cell Signaling Technology) na diluição 1:100 e anti-SOX17 anticorpo de coelho (Millipore) com diluição de 1:100. No dia seguinte, coloração do anticorpo secundário com Alexa Fluor 488 (Life Technologies) na proporção 1:2000 foi realizada sobre as colônias de iPS. Subsequentemente, todas as colônias iPS foram coradas com 49,6-DAPI - diamidino-2-fenilindole (Sigma) antes da análise microscópica fluorescente.

2.3.2. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real

O RNA do total das linhagens celulares foi extraído pelo método do Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (Nonodrop, Thermo Scientific, EUA). O RNA total das linhagens celulares foram transcritos em DNA complementar (cDNA), utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), utilizando-se 2µg de RNA (1000ng/mL). Estas reações foram levadas ao termociclador com as seguintes condições de ciclagem: 94°C, 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final 72°C por 10 minutos. O cDNA foi mantido em freezer -80°C até a realização da técnica de PCR em tempo real.

Tabela 1. Sequência de Primers para transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase.

Genes	Sequência Primers (5` - 3`)
Oct-4_F	ATAGATCTCATGGCTGGACACCTGGCT
Oct-4_R	AGTCTAGACTCAGTTTGAATGCATGGGAGATGT
Nanog_F	CATCCTGAACCTCAGCTACAAACA
Nanog_R	TTGCTATTCTTCGGCCAGTTGT
Sox-17_F	TTTCATGGTGTGGGCTAAGGA
Sox-17_R	GCGCCTTCCACGACTTGC
ActB_F	AAGGCCAACCGTGAAAGATG
ActB_R	GTGGTACGACCAGAGGCATACA

2.4. Protocolo Experimental

A) Modelo animal de insuficiência renal crônica

Foram utilizados 21 ratos Wistar fêmeas com um peso inicial de 250g a 300g. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas e princípios de ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e mantidos em gaiola coletiva previamente à realização dos procedimentos cirúrgicos e posteriormente alocados em gaiolas individuais e com livre acesso à água e dieta padronizada.

B) Técnica operatória

a) Pré-operatório

Após pesagem do animal a indução anestésica foi realizada com administração de 50 mg/kg de Ketamina e 10mg/kg de Xilazina por via intraperitoneal. Em seguida os animais foram tricotomizados e posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal

horizontal, tendo suas extremidades fixadas e então submetidas ao procedimento cirúrgico.

b) Técnica operatória - Redução massa renal - modelo 5/6

Após anestesia, em posição supina, foi realizada a laparotomia longitudinal xifopubiana, seguida da evisceração do conteúdo abdominal para a direita do animal, expondo o hilo renal e os ramos da artéria renal esquerda. Foi realizada então a ligação de 1 ramo da artéria renal esquerda, resultando em infarto de 5/6 do parênquima renal esquerdo.⁶⁸ A última etapa foi a nefrectomia total direita, realizada em bloco usando fio de seda 5.0. Após o término do procedimento a cavidade abdominal dos animais foi suturada com fio de Nylon 2.0 com pontos contínuos.

c) Infusão das iPs e CTM no parênquima renal

Após a redução de massa, a cápsula renal foi removida da interface da região renal infartada/saudável. Em seguida, os animais receberam infusão de colônias de iPS ou CTMs (1×10^6) ou meio de cultura isoladamente no parênquima renal. Cada grupo recebeu 1×10^6 de células suspensas em 10 μ L de meio de cultura. (Tabela 2). As células foram infundidas no parênquima renal, mais precisamente entre a área infartada e a área saudável ou remanescente. Somente após este procedimento que a cavidade abdominal dos animais foi suturada.

Tabela 2: Divisão dos grupos experimentais

Grupos	Cirurgia	Tratamento	Local da infusão
S (n=3)	Sem redução de massa	-	-
CRF (n=5)	Redução de 5/6 da massa renal	Meio de cultura	Parênquima
iPS (n=8)	Redução de 5/6 da massa renal	iPS	Parênquima
CTM (n=5)	Redução de 5/6 da massa renal	CTM	Parênquima

S: grupo Sham; CRF: Redução de massa renal; iPS: Células pluripotentes induzidas; CTM: células-tronco mesenquimais.

2.5. Creatinina plasmática (CrP), Proteínúria (PT24hs), Ureia Plasmática (UrP), Osmolalidade urinária (UOsm), Variação da creatinina plasmática (Δ CrP), Clearance de creatinina (ClCr) e Taxa de Declínio do Clearance (TDCI)

Os animais foram colocados em gaiola metabólica ao final do período de tratamento. Após 24 horas na gaiola metabólica, foi verificado o volume da diurese coletada, e a urina foi centrifugada e utilizada para as dosagens bioquímicas.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal Xilazina+Ketamina (50mg/ml); na proporção de 0,1ml a cada 100g de rato, o sangue foi coletado da veia cava abdominal, para as dosagens bioquímicas. A urina e o plasma foram utilizados para as seguintes dosagens: osmolalidade em osmômetro através do ponto de congelamento (Osmette A, Precision Systems, Natick, MA, EUA) creatinina plasmática (CrP) pelo método de picrato alcalino (Jaffé) e analisada por espectrofotômetro (BTS 310 ByoSystems, Barcelona, Espanha), proteinúria (PT 24hs) e Ureia Plasmática (UrP) através espectrofotômetro (BTS 310 ByoSystems, Barcelona, Espanha).

a) Proteinúria de 24 hrs (PT24h)

Na véspera do sacrifício os animais foram deixados em gaiolas metabólicas por 24 horas, com coleta de urina e registro do volume urinário. O volume urinário de 24 horas coletado foi medido e centrifugado durante 10 minutos. A dosagem da proteinúria foi realizada através do kit comercial (Biotécnica, MG, Brasil) e mensurada por espectrofotômetro com absorvância em 530nm e o valor calculado pela multiplicação do volume de urina (mL) coletado em 24 horas com a concentração da proteína em mg/mL, resultando em um valor de mg/24h.

b) Creatinina Plasmática (CrP)

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

c) Ureia Plasmática (UrP)

A dosagem de ureia plasmática foi realizada através do kit comercial (Biotécnica, MG, Brasil) e nessa técnica a uréia da amostra é hidrolisada pela enzima urease com produção de gás carbônico e íons de amônio. Esses são captados por uma segunda enzima, a glutamato desidrogenase, que na presença de substratos NADH e α -

cetoglutarato produz NAD^+ e glutamato. A taxa de diminuição do NADH no meio foi medida por espectrofotômetro em 340nm, sendo proporcional a concentração de ureia na amostra.

d) Osmolalidade Urinária (OUsm)

A Osmolalidade foi mensurada em osmômetro (Osmette A, Precision Systems, Natick, MA, EUA) através do ponto de congelamento.

e) Variação da Creatinina (ΔCr)

A variação da creatinina em mg/dL foi obtida através da diferença entre os valores basais e os valores obtidos após 60 dias.

f) Clearance de creatinina (CICr) e Taxa de Declínio do Clearance (TDCI)

O cálculo do Clearance de creatinina foi feito após a cirurgia (Basal) e no final do experimento, após 60 dias, através da fórmula:

$$\text{Clearance de creatinina} = (U \text{ (mg/dL)} \times V \text{ (ml/min)}) / P \text{ (mg/dL)} = \text{(ml/min)}$$

$$U \text{ (mg/dL)} = \text{concentração urinária de creatinina}$$

$$V \text{ (ml/min)} = \text{volume urinário}$$

$$P \text{ (mg/dL)} = \text{concentração plasmática de creatinina}$$

O resultado desta fórmula proporcionou a análise da função renal de cada animal. A taxa de declínio do clearance de creatinina (TDCI) foi calculada subtraindo o valor inicial do final do CICr e dividindo por 60 dias (mL/min./dia).

g) Peso dos animais

Os animais foram pesados nos dias 0 e 60 após a cirurgia e os valores utilizados para avaliar a evolução dos animais durante o estudo.

2.5.1. Medida da Pressão Caudal

A pressão arterial caudal foi medida nos dias 0 e 60. Para tal, os ratos foram colocados em sala apropriada no período da manhã, com treinamento prévio do animal. A pressão caudal foi medida por um equipamento transdutor de pressão, Pletismógrafo caudal Versão 2.11 (Insight, São Paulo, Brasil), o qual registra os dados em um sistema computadorizado. As medidas foram analisadas com os animais acordados e foram consideradas apenas aquelas obtidas em condições de ausência de movimento do animal.

2.6. Avaliação histológica e imunohistoquímica

Ao término do estudo, após 60 dias, os animais foram sacrificados por meio de infusão intraperitoneal excessiva do anestésico e submetidos à nefrectomia do rim esquerdo para a realização da análise imunohistológica e extração de RNA.

Após a nefrectomia esquerda, a cápsula renal foi retirada e uma pequena parte separada para extração de RNA. Posteriormente o rim foi seccionado longitudinalmente e fixado em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2M por 2 dias. O material foi processado pela técnica de inclusão em parafina e submetido à microtomia.

2.6.1. Análise Histológica

O processo de parafinização foi iniciado com a desidratação dos tecidos. O material parafinado foi incluído em blocos (molde) e permaneceu em temperatura ambiente. Os fragmentos, com espessura de 3 a 4µm, foram aderidos em lâminas previamente revestidas por silanizadas com solução de Silano a 4% (Sigma Chemical,

CO, St Louis, EUA). Previamente às colorações, as lâminas passaram por um processo de desparafinização, que consiste em deixar as lâminas por 30 minutos em estufa a 60°C, posteriormente as lâminas foram imersas em xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 9 minutos por duas vezes. Em seguida, as lâminas foram desidratadas, através de banho em etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha), etanol 96% e etanol 70% para finalizar. Ao final, as lâminas foram imersas em água corrente e destilada.

Seguida à desparafinização, as lâminas foram imersas em uma solução de Hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Em seguida, foram lavadas rapidamente em água corrente, permanecendo no escarlata de Briebrich (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) durante 5 minutos e novamente lavadas em água corrente. Depois, as lâminas foram submersas em um diferenciador de Masson durante 5 minutos, seguindo para a solução de anilina a 5%. As lâminas foram então lavadas em água corrente e em água acética a 1%, para fixação em anilina. Posteriormente passaram pelo processo de desidratação e diafanização e foram montadas com meio permanente *Permount* (Fisher Chemical, Pittsburgh, EUA). A técnica de Masson foi utilizada para a avaliação do grau de expansão de fibrose no interstício do córtex renal.

2.6.2. Imunohistoquímica

Para a técnica de Imunohistoquímica foi utilizado o kit Expose Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC (Abcam 80436, USA) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Após a inclusão do material em parafina, foram obtidos cortes de 5µm de espessura. Esses foram montados em lâminas com filme de silano a 4%. Após o processo de desparafinização as lâminas foram hidratadas em solução salina fosfato-tamponada (PBS pH 7,4). A solução de PBS foi preparada utilizando-se reagente

Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), concentração: 0,007 M (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), concentração: 0,025 M (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e Cloreto de sódio, concentração: 0,14 M (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). O pH da solução de PBS foi ajustada para 7,4 com ácido clorídrico (Merck, Darmstadt, Alemanha). A técnica utilizada para fixação do tecido pode causar o “mascaramento” do antígeno, dificultando a detecção do mesmo. Para este trabalho, utilizamos a técnica da panela à vapor. As lâminas foram imersas em tampão Citrato (2,1g de ácido cítrico mono hidratado, pH=6,0) (Merck, Darmstadt, Alemanha) pré aquecido a 100°C e mantidas ao efeito do vapor por 30 minutos. Ao termino do processo as lâminas foram resfriadas lentamente até atingir a temperatura ambiente e lavadas com água destilada para retirada total do Citrato, permanecendo posteriormente mergulhadas em PBS. As lâminas foram processadas e submetidas a reações de anticorpos primários para identificação da expressão de células em atividade proliferativa (anti-PCNA- *Proliferating cell nuclear antigen* - Ab92552), formação de miofibroblastos (anti- α -SMA- *Alpha Smooth Muscle Actin* - Ab32575), identificação de macrófagos (anti-CD68 - *Cluster of differentiation CD68* - Serotec, Bio-Rad Company, EUA) e para identificar fibrose tecidual utilizamos (anti-TGF- β – *Transforming growth factor beta* - Ab80436) e para verificar a formação de endotélio vascular foram utilizados anticorpos (anti-VEGF – *Vascular endothelial growth factor* - Ab1316) conforme Tabela 3. O controle negativo foi realizado em todos os experimentos, sem a utilização do anticorpo primário específico. Para avaliação do número de células positivas para CD68 (macrófagos e monócitos) e PCNA, foi contado, em microscópio óptico, o numero de células imunomarcadas por campo (aumento de 40x, área do campo: 0,245 mm²), em 30 campos consecutivos nos glomérulos e no

interstício na região cortical, e em 20 campos consecutivos na região da medula externa renal. O número total obtido na contagem foi dividido pelo número de campos contados e foi determinado o número médio de células por campo analisado por animal. Esse procedimento foi avaliado por um único avaliador. Os marcadores TGF- β , VEGF e α -actina foram analisados por *Score* 0 a 100% para a zona cortical renal (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição dos Anticorpos utilizados na técnica de Imunohistoquímica.

Anticorpo	Diluição	Origem
Anti-PCNA	1:500	Abcam
Anti-CD68	1:250	Serotec
Anti-TGF- β	1:250	Abcam
Anti-VEGF	1:400	Abcam
Anti- α -SMA	1:250	Abcam

2.7. Análise expressão genes por PCR em tempo real

2.7.1. Extração de RNA

A técnica de extração de RNA do tecido renal foi realizada com o reagente Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante. Em um cadinho, a amostra foi mergulhada em nitrogênio líquido e com auxílio de um pistilo foi macerada, e para cada 50-100 mg de tecido foi adicionado 1 mL de Trizol. A mistura foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e centrifugada por 10 minutos a 12.000g, à 4°C. Descartado o *pellet*, foi adicionado ao sobrenadante 200 μ L de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha). A mistura foi novamente homogeneizada por inversão e deixada em temperatura ambiente por 5 minutos (início da separação de fases). Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 12000g, por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase superior contendo RNA foi transferida para um novo

microtubo e adicionado 500 μL de Isopropanol gelado (proporção 1:1) (Sigma, Chemical Co, St Louis, EUA), agitado por inversão durante 1 minuto. A mistura foi novamente centrifugada a 14000g, por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA “lavado” com 1 mL de etanol 70% gelado. Após a secagem do etanol, o *pellet* de RNA foi eluído em 20 μL de água Depec (Invitrogen, EUA) e armazenado em freezer -80°C.

A dosagem do RNA foi realizada pelo equipamento Qubit Fluorometer Quantitation 2.0 (Invotrogen, Life Technologies Carlsbad, CA, EUA), baseado na detecção de fluorescência específica do alvo (RNA), o sistema integrado é mais sensível do que a quantificação baseia-se na leitura por absorvência de UV e utilizando kit Qubit Assays (Q32850, Life Technologies, EUA), conforme instruções do fabricante.

2.7.2. Síntese de cDNA

Para a síntese da fita de DNA complementar (cDNA) o kit utilizado foi *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), adicionou-se em um tubo para cada amostra, 2 μL de eluição de RNA (1000ng/mL) adicionado a 8 μL de H₂O Depec (Merck, Darmstadt, Alemanha), totalizando uma solução de 10 μL de RNA, a esta solução foram adicionados 2 μL de Buffer (10x RT Buffer), 0,8 μL de dNTP (25x dNTP Mix 100mM), 2,0 μL Primer (10xRT radom Primers), 1,0 μL Enzima (MultiScrib Reverse Transcriptase 50U/ μL) e 4,2 μL de água Depec (Merck, Darmstadt, Alemanha), totalizando 20 μL em cada reação. Estas reações foram levadas ao termociclador com as seguintes condições de ciclagem: 94°C, 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final 72°C por 10 minutos. O cDNA foi mantido em freezer -80°C até a realização da técnica de PCR em tempo real.

2.7.3. PCR em tempo real

O PCR Quantitativo em tempo real (QRT-PCR), foi realizado utilizando o aparelho StepOne Plus PCR em tempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para a realização desta etapa utilizamos sondas Taqman inventoriadas (Applied Biosystems) para os genes GAPDH (Rn01775763_g1; gene para controle endógeno), IL-6 (Rn01410330_m1), IL-10 (Rn00563409_m1), VEGF (Rn01511601_m1), and TGF- β (Rn00572010_m1) de acordo com as instruções do fabricante. Os valores expressos relativamente ao RNA são obtido a partir de grupos não tratados. A quantificação dos genes alvo foram normalizados pelo controle do gene endógeno. O ciclo limiar (CT) para o gene alvo e o Ct de controle interno foram determinados para cada amostra, executado em triplicatas. A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.⁶⁹

2.8. Identificação da presença do gene SRY no tecido renal

As células CTM e iPS isoladas a partir de ratos machos foram injectados em ratos do sexo feminino para detecção do gene SRY (localizado no cromossomo Y ([GenBank : FJ168067.1])). O RNA total foi isolado a partir de rim, utilizando o reagente Trizol (Life Technologies) e a concentração de RNA foi determinada utilizando Qubit fluorómetro 2.0 de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA , EUA) como anteriormente descrito. A reação de transcrição reversa foi realizada com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) utilizando 1 μ g de RNA total, a reação de quantificação de PCR em tempo real foi realizada utilizando o StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando as sondas TaqMan (Applied Biosystems) para GAPDH (Rn01775763_s1; controle

endógeno) e SRY (Rn04224592_u1) em condições para a reação de PCR em tempo real.

2.9. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados foram submetidos à estatística descritiva e teste de normalidade. A avaliação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste Student-Newman-Keuls, quando as amostras tinham distribuição normal, ou pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, quando a distribuição não foi normal. A comparação entre os dois grupos foi feita pelo teste t de Student para as amostras independentes (distribuição normal) ou teste de Mann-Whitney (distribuição não normal). Foi considerado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

3.RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Obtenção das células-tronco, isolamento e caracterização das CTMs e iPS

As CTMs derivadas de medula óssea de ratos *wistar* machos mostraram fenótipos semelhantes a fibroblastos em cultura e foram isoladas por aderência ao frasco de cultura. As CTMs foram capazes de se diferenciar em adipócitos e osteoblastos e expressaram marcadores comuns de CTMs CD90 e CD73.

As células iPS derivadas de fibroblastos de pele de rato utilizando STEMCCA (OKSM), as mudanças na morfologia das células avaliadas 6-8 dias após a infecção. As colônias que foram clonalmente expandidas apresentaram a morfologia típica de células-tronco embrionárias (Figura 3A). A imunocoloração demonstrou que as iPSCs transduzidas mantiveram a expressão dos marcadores pluripotentes OCT-4 e SOX-17 (Figura 3B), sugerindo que a expressão do gene repórter não influenciou significativamente a pluripotência das iPS. Para testar a expressão dos genes durante a diferenciação das células em pluripotentes iPS foi realizada a análise por RT-PCR (Figura 3C).

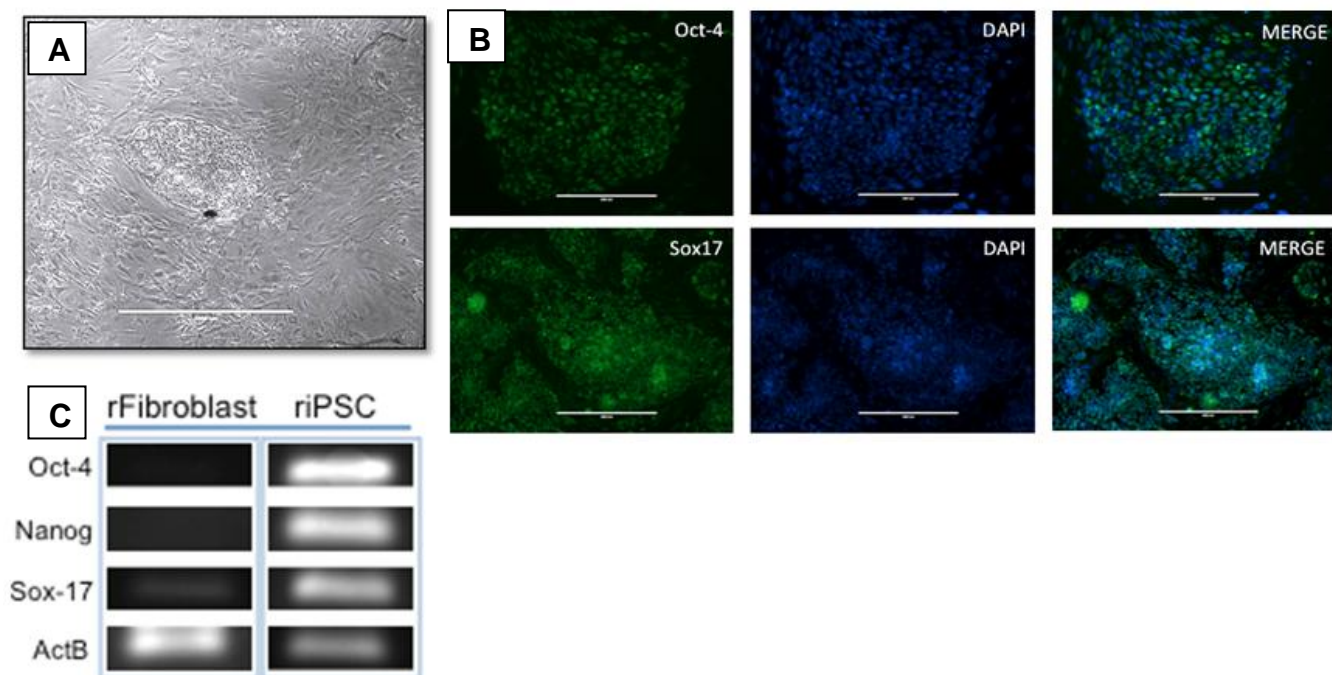


Figura 3. Caracterização das células-tronco pluripotentes induzidas (iPS). (A): Morfologia das colônias de células iPS. (B): Coloração de imunofluorescência de ratos células-tronco pluripotentes induzidas para a expressão de marcadores de pluripotência o OCT-4 (painéis superiores, barra de escala de 400 mm) e SOX-17 (painéis inferiores, barra de escala 1000um) e sobreposição com a coloração controle do núcleo com DAPI (Sigma). (C): Análise de RT-PCR da expressão do gene em células indiferenciadas RiPs.

3.2. Inoculação das CTMs e iPS

As CT mesenquimais e iPS foram infundidas no parênquima renal, mais precisamente entre a área infartada e a área renal remanescente. (Figura 4)

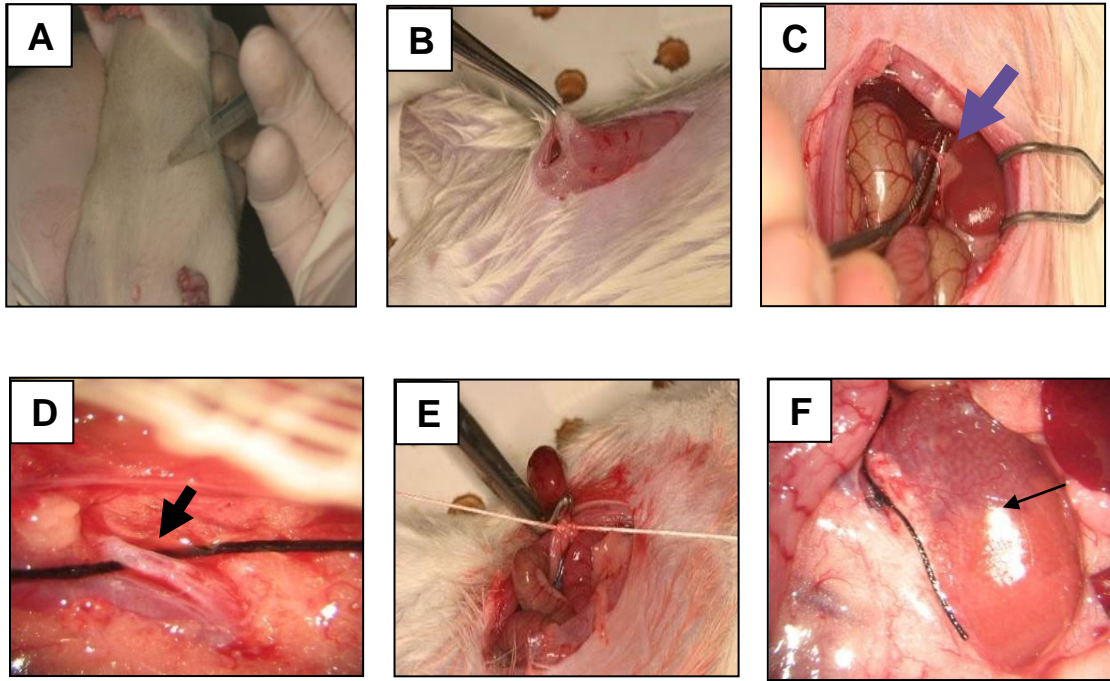


Figura 4. Método de Nefrectomia (CRF) 5/6. (A): Administração intraperitoneal de anestesia nos animais. (B): Laparotomia. (C): Localização da artéria renal esquerda. (D): Isolamento da artéria renal esquerda (50x). (E): Ligadura de um ramo da artéria renal esquerda. (F): Observação da área infartada e área renal remanescente e infusão das CTMs ou iPS no cortex renal (seta).

3.3. Parâmetros bioquímicos e estudos funcionais

O tratamento com iPS e CTMs reduziram os níveis de creatinina plasmática (CrP) em 22% e 32% respectivamente, enquanto que redução de 40% dos níveis de ureia plasmática (UrP) foi notada apenas no grupo tratado com as CTMs, quando comparados com os animais não tratados (CRF). As variações dos índices de CrP foram avaliadas pela diferença entre os valores basais avaliados e após 60 dias de tratamento (Δ CrP) e mostraram significativa diminuição nos animais tratados com CTMs (Tabela 4). A filtração glomerular medida pelo Clearance de Creatinina (ClCr) aumentou 2 vezes com ambos os tipos de tratamento, (CRF = $0,31 \pm 0,04$ vs CTM = $0,66 \pm 0,2$ vs iPS = $0,60 \pm 0,2$ ml/min; P=0,04). A progressão da doença medida pela taxa de declínio do clearance de creatinina (TDCI), mostrou um retardado significativo no grupo CTMs (IRC = $0,012 \pm 0,002$ vs CTM = $0,007 \pm 0,004$ vs iPS = $0,009 \pm 0,006$ mL/min/d; P = 0,04) (Tabela 4). Curiosamente, decréscimo na PT24h foi observada apenas nos animais tratados com iPS (Tabela 4). Houve pequena redução na pressão arterial nos grupos tratados e a osmolalidade urinária foi semelhante entre os três grupos (Tabela 4). Os animais com IRC apresentaram grande redução do peso corporal (160%) como consequência da progressão da doença, enquanto que animais do grupo CTM apresentaram moderada perda de peso (53%). Ratos tratados com iPS perderam mais peso (109%), apesar da melhora na função renal.

Tabela 4. Função renal parâmetros avaliados no final do estudo (60 dias)

Parâmetros	Grupos			
	Sham	IRC	CTM	iPS
Pressão Arterial (mmHg)	127±1	192±35.7	178±54.5	176±59
CrP (mg/dL)	0.6±0.1 ^a	1.2±0.2	0.81±0.13	0.94±0.37
ΔCrP (mg/dL)	0.02 ± 0.09	0.61±0.28 ^b	0.19±0.16	0.39±0.39
UrP (mg/dL)	58±3 ^a	141±42	84.8±12 ^c	120±40
PT24h (mg/24h)	1±0.2 ^a	76.6±41.5 ^b	57.12±22	12.2±42.6 ^d
ClCr (mL/min)	0.75±0.1 ^a	0.31±0.04	0.66±0.2 ^c	0.60±0.2 ^c
TDCI (mL/min/d)	0.0001±0.006	0.012±0.002 ^b	0.007±0.004	0.009±0.006
Peso corporal (g)	11 ±48	-17.6±22.2	5.8±30.6	-12±32

Os resultados são descritos em média ± DP. As abreviaturas são: CrP = creatinina plasmática; TDCI = taxa de declínio do clearance; UrP= ureia plasmática; PT24h = proteinúria de 24 horas; ClCr = clearance de creatinina, ΔCrP = Variação creatinina sérica; IRC= insuficiência renal crônica; iPS= células pluripotentes induzidas; CTM = células-tronco mesenquimais. ^aP < 0,01 vs IRC; ^bP < 0,05 vs CTM; ^cP < 0,05 vs IRC; ^dP < 0.001 vs IRC;.

3.4. Histologia renal

Nos animais submetidos à nefrectomia 5/6 verificou-se um grande número de glomerulos esclerosados após 60 dias. No entanto, observou-se nos grupos tratados com CTMs e iPS diminuição significativa da glomerulosclerose (EG), quando comparados ao grupo sem tratamento (Tabela 5).

A atrofia tubular (AT) foi semelhante nos três grupos e a fibrose intersticial (FI) foi maior no grupo tratado com iPS. A infiltração linfocitária (IL) foi reduzida com ambos tratamentos, quando comparadas ao grupo controle, embora sem significância estatística (Tabela 5).

Tabela 5. Alterações histológicas e o efeito do tratamento com as CTM e iPS em animais com nefrectomia 5/6.

	IRC	CTM	iPS
EG	23,6±13 ^a	4±3	1,8±1
AT	15,7±11	14±10	21,2±21
FI	18,3±13,6	18±11	32,5±28,4
IL	16,7±13	11±9	8,75±10

Os dados são expressos como média ± DP. Abreviaturas: IRC= insuficiência renal crônica não tratada; CTM = ratos com IRC tratados com CTM; iPS = IRC tratados com células-tronco pluripotentes induzidas; EG = esclerose glomerular; AT = atrofia tubular; FI = fibrose intersticial; IL = infiltrado linfocitário intersticial. (^aP<0,01 vs. CTM e iPS).

3.5. Formação de tumores em ratos tratados com células iPS

Após 60 dias os animais foram sacrificados e a análise macroscópica e histológica mostraram formações tumorais em 5 dos 8 rins dos animais (62%) que receberam tratamento com as células iPS. Não foram encontrados esses “tumores” no grupo tratado com CTM (figura 5).

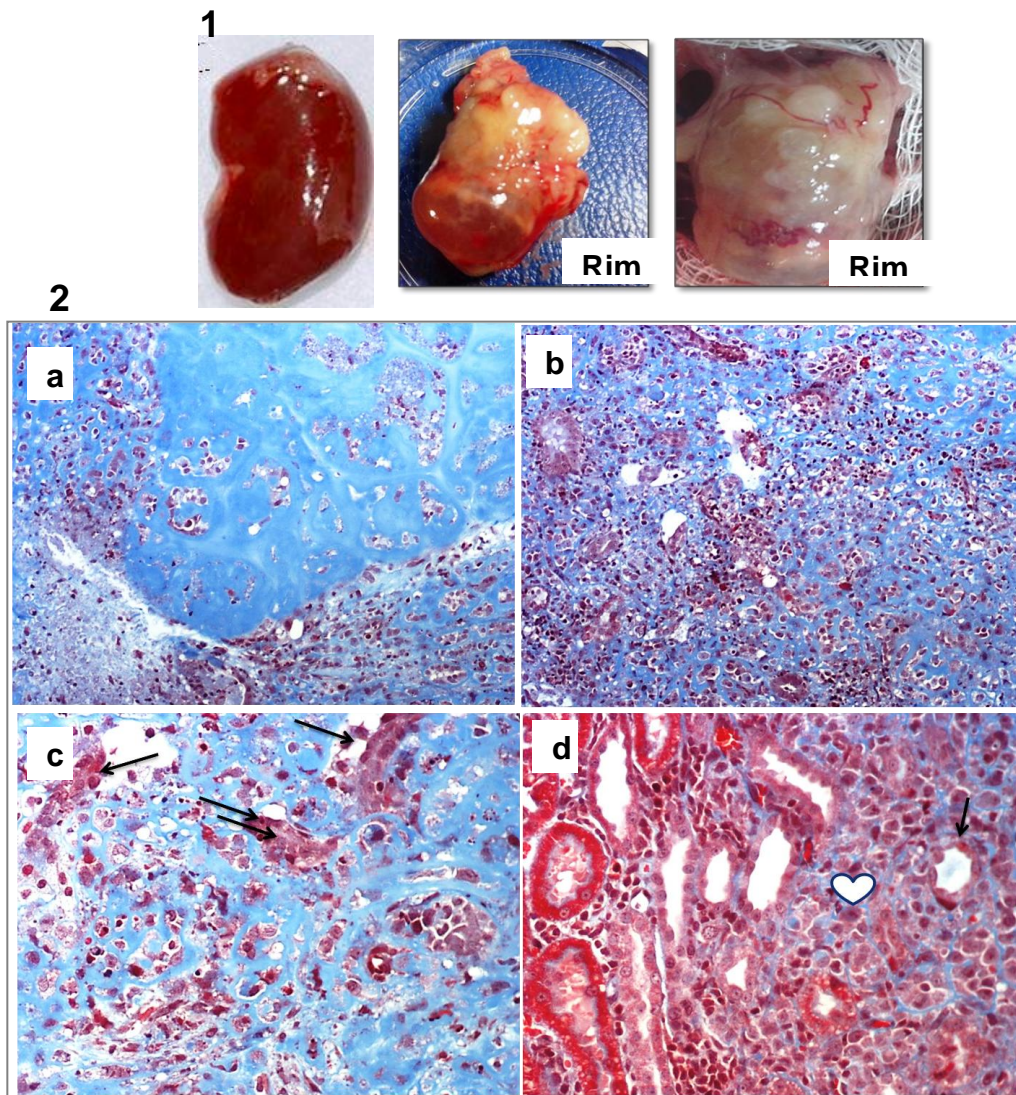


Figura 5. Imagens macroscópicas e microscópicas mostraram “tumores” formados a partir da infusão as células iPS no parênquima renal após 60 dias. (1) (a) Rim apresentando tamanho e aparência normal; (b e c) macroscopia mostra a superfície com tumores renais; (2) a) Corte histológico de rim com tumor mostrando a diferenciação de células de tumor em cartilagem (Ampliação:100x; Coloração Tricromo de Masson); b) Intensa proliferação de células estromais (Coloração Tricromo de Masson - Ampliação 100x); c) Células localizadas no estroma formando alguns túbulos (seta) (Coloração Tricromo de Masson – Ampliação: 200x); d) Células tumorais (♥) e formação de túbulos (seta) (Coloração Tricromo de Masson - Ampliação: 200x).

3.6. Achados Imunohistoquímicos

A infiltração de macrófagos foi significativamente reduzida no grupo iPS em comparação ao grupo IRC (Figura 6E e 7A). A técnica de imunohistoquímica para PCNA mostrou que após o transplante de células iPS houve uma significativa diminuição no número de células tubulares, quando comparado com o grupo controle e menor expressão dos marcadores para PCNA e macrófagos após o tratamento com as CTMs (Figura 6C e 7B).

A coloração para α -SMA e o VEGF foi semelhante em todos os grupos (Figuras 6A e D e 7C e D). Em contraste, não foram observadas reduções importantes na resposta inflamatória (TGF- β) no grupo de tratamento CTM ($P < 0,05$) (Figura 6B e 7E).

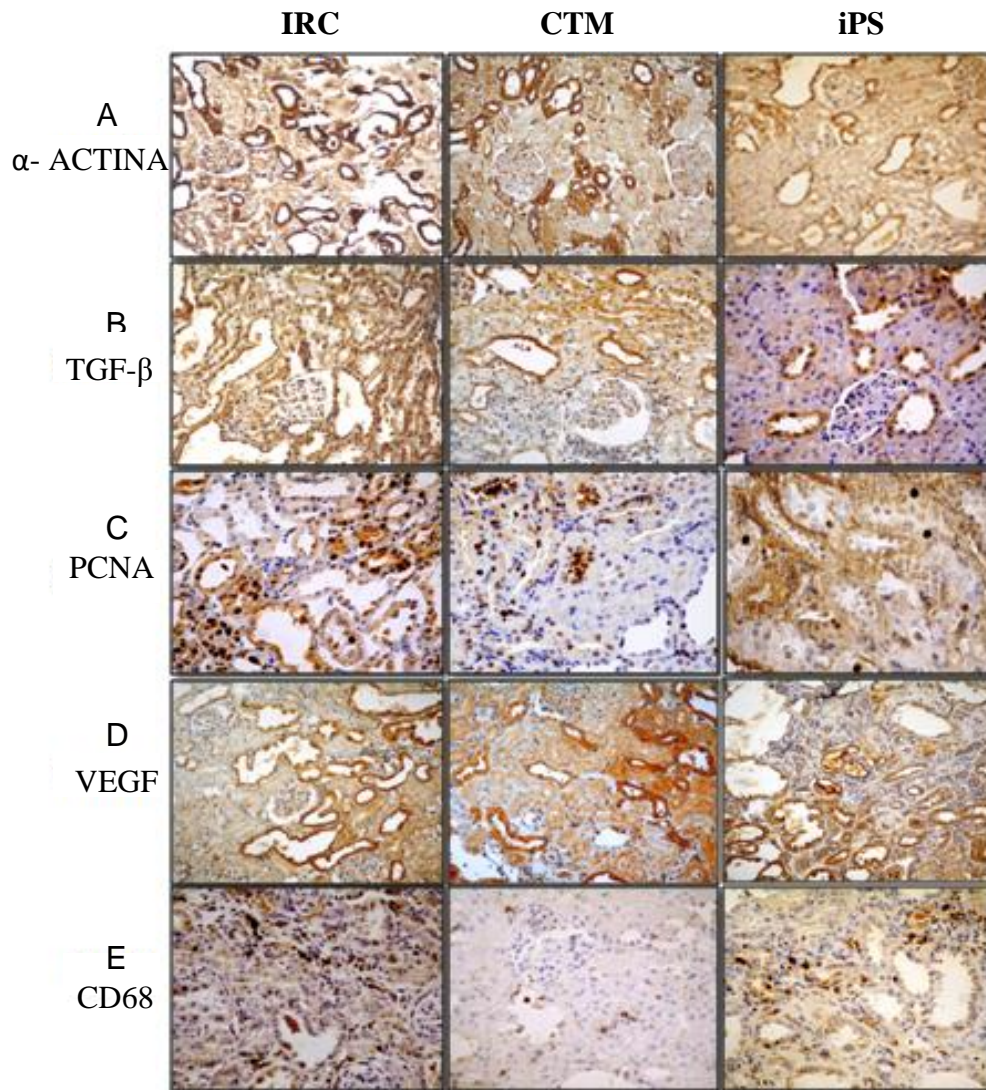


Figura 6. Imagens representativas de células CD68 (macrófagos), α -ACTINA, PCNA, TGF- β e VEGF no córtex renal de animais com IRC tratados com CTM e iPS 60 dias após o tratamento. (Ampliação: 400x).

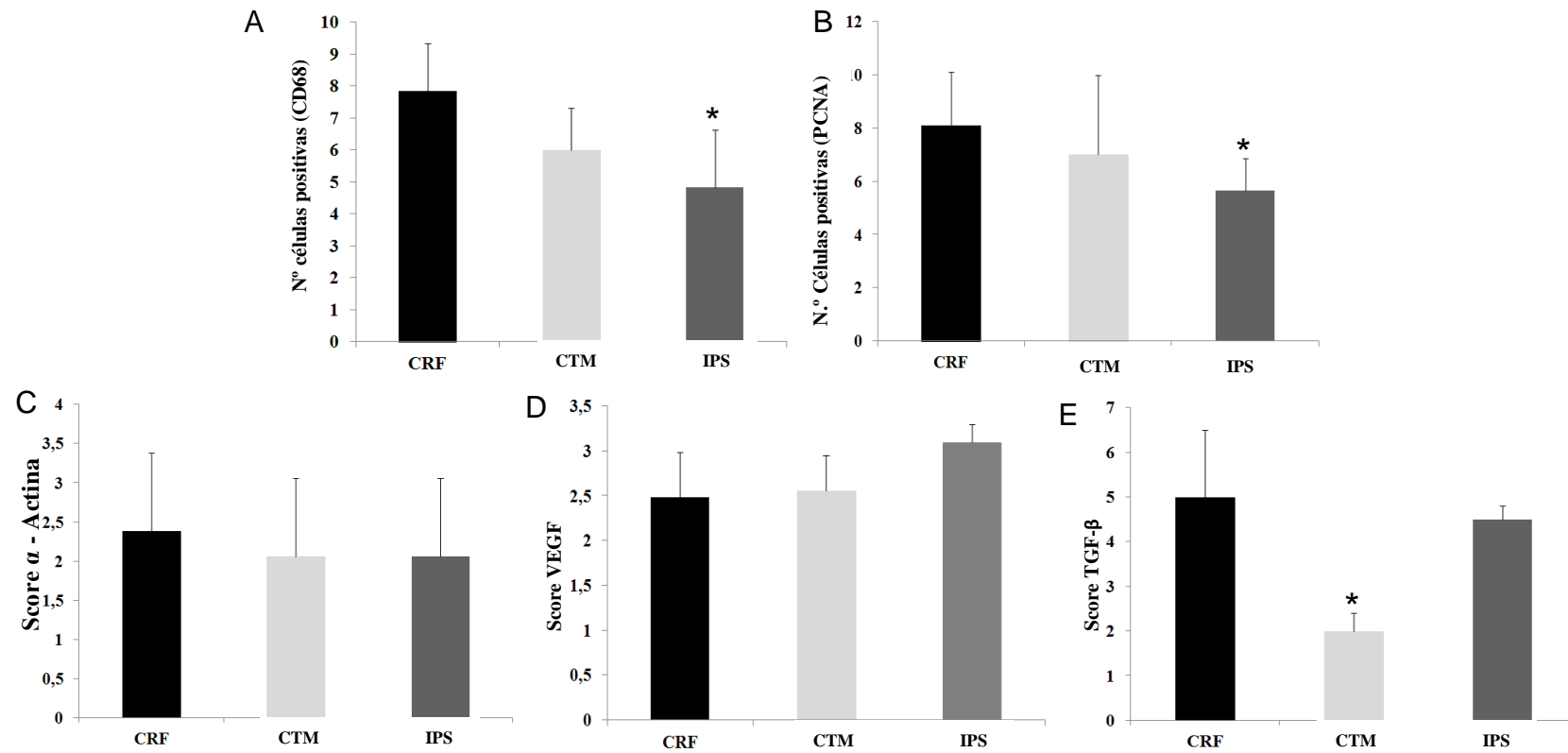


Figura 7. Gráficos representativas de células CD68 (macrófagos), α -ACTINA, PCNA, TGF- β e VEGF no córtex renal de animais com IRC tratados com CTMs e iPS 60 dias o tratamento. * P<0,05 vs CRF.

3.7. Expressão de citocinas no tecido renal

A expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TGF- β , anti-inflamatórias como a IL-10 e a expressão do gene VEGF para verificação de possíveis formações de novos vasos nos tecidos renais, foram avaliadas 60 dias após a cirurgia de Nx 5/6. A análise da expressão dos genes mostraram uma maior expressão de TGF- β no grupo iPS em comparação com o grupo controle IRC (P=0,018) enquanto o gene VEGF foi altamente expresso nos grupos tratados com células iPS e CMT quando comparado com ao grupo IRC (P=0,016) (Figura 8). A IL-6 mostrou níveis de expressão semelhantes independentemente do tipo de célula utilizado para o tratamento. A expressão da IL-10 não atingiu significância estatística entre os três grupos (Figura 8).

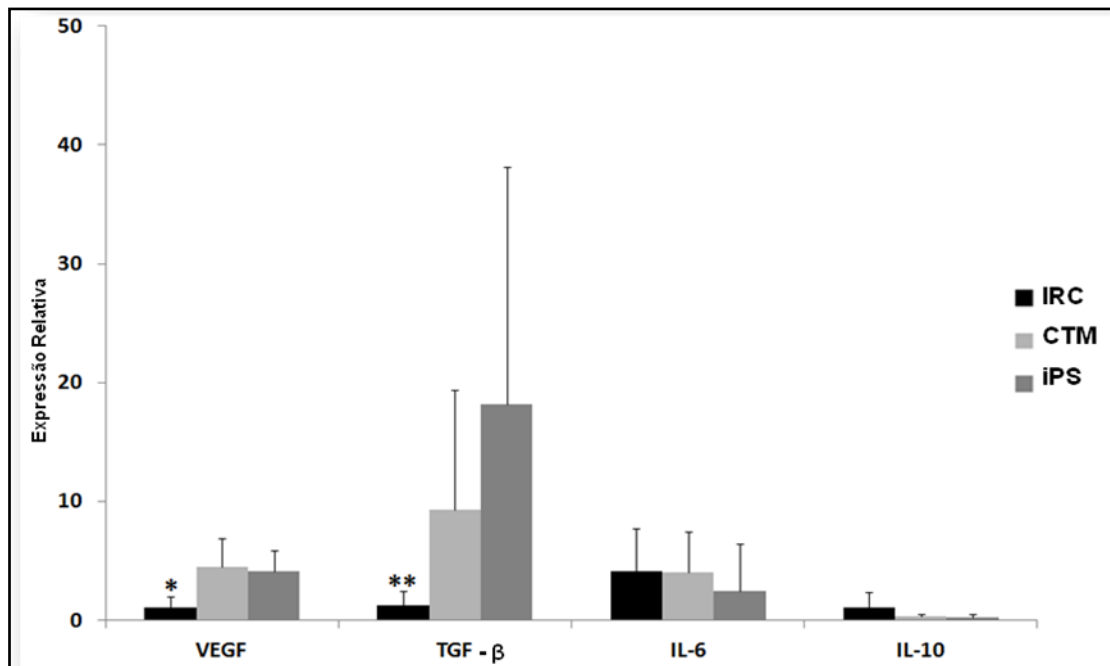


Figura 8. Expressão das citocinas no tecido renal. Expressão dos genes em rins de animais tratados (CTM e iPS) e não tratados (CRF). O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno da reação. Dados expressos como média de $2^{-\Delta\Delta CT} \pm DP$. (* $P < 0,05$ vs. CTM e iPS; ** $P < 0,05$ vs. iPS).

3.8. Presença do gene SRY

Para determinar a existência do quimerismo das CT transplantadas foi realizada a técnica de PCR em tempo real para o gene SRY utilizado para detectar o DNA do rato macho doador. Os resultados mostraram que a expressão do RNAm do gene SRY não foram detectadas no tecido renal dos animais tratados com CTM, indicando ausência de células positivas SRY. Curiosamente, nos animais tratados com as células iPS e que apresentaram tumores, foi detectada a presença do gene SRY. Esta discrepância entre os resultados quiméricos sugere que as células iPS estão localizada no tecido do tumor (Figura 9).

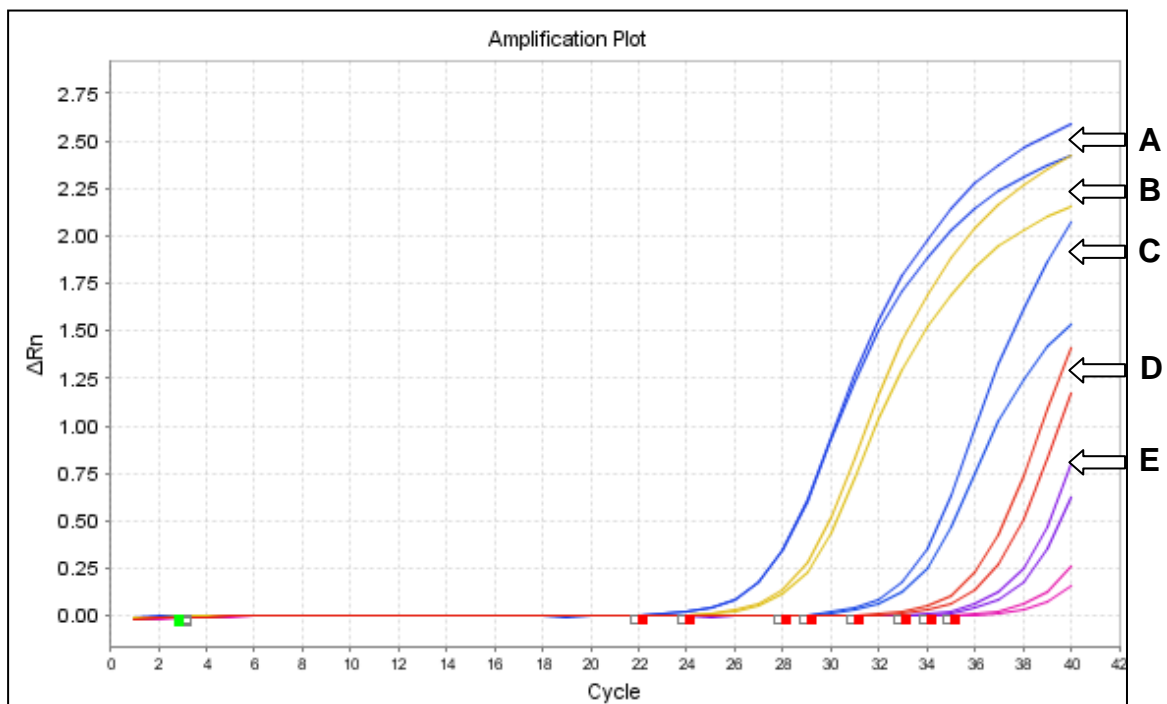


Figura 9. Estudo do quimerismo das células iPS, por PCR em tempo real para a detecção do gene SRY. A presença de DNA do rato macho doador foi localizados nas fêmeas receptoras das células iPS. A curva **A**, corresponde a um controle positivo de DNA de rato macho, as curvas **B-E** representam a presença do gene SRY em fêmeas receptoras após a infusão de células iPS e que desenvolveram tumores.

4. DISCUSSÃO

4.DISSCUSSÃO

A doença renal crônica (IRC) vem aumentando ao longo dos anos e embora tenha havido melhora no seu diagnóstico o tratamento continua sendo a terapia dialítica e/ou transplante renal.⁶ A terapia celular com CT surge como promessa para regenerar rins cronicamente lesados mas, ainda existem dúvidas sobre o melhor tipo de células para ser usado e sobre o papel por elas desempenhado na reparação do parênquima renal.

Dados preliminares obtidos em nosso laboratório demonstraram que ratos com IRC tratados com células-tronco mesenquimais (CTM) injetadas no parênquima renal lesado pode estabilizar a progressão da IRC.^{4,44,70} No entanto, as CTM possuem limitada capacidade de proliferação e diferenciação dificultando o uso rotineiro dessas células em protocolos clínicos. Ao contrário, as células iPS podem fornecer uma fonte ilimitada de células para o tratamento devido às características de elevada pluripotência, além da possibilidade de poder serem reproduzidas à partir de células do próprio paciente, e com isso eliminando dilemas éticos.

Em nosso conhecimento os efeitos das iPS na doença renal crônica experimental ainda não foram relatados na literatura. Assim, este estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito das iPS na progressão da IRC.

Utilizando fibroblastos modificados geneticamente para expressão adequada de genes relacionados a pluripotência (OCT4, SOX2, KLF4 E C-MYC) e que regulam positivamente genes endógenos, obtivemos uma reprogramação das células diferenciadas para um estado de pluripotência. As células reprogramadas foram caracterizadas utilizando parâmetros como morfologia, capacidade de formação de

corpos embrióides e perfil de expressão gênica de marcadores de pluripotência como descrito previamente.⁷¹

Os resultados obtidos com uso “in vivo” das CTM e células iPS no presente estudo utilizando o modelo experimental de IRC, demonstraram que ambos os tratamentos foram eficazes para retardar a progressão da IRC. Os dois tipos de células aumentaram em duas vezes o CICr e retardaram significativamente a TDCl (tabela 4), sugerindo um efeito benéfico dessas células. Adicionalmente, a infusão de células iPS resultou em redução de 85% da proteinúria (PT24h) em comparação ao grupo CRF5/6. Esse achado pode ter importância na prática clínica, pois a PT24h é um fator de risco para a progressão da IRC e sua fisiopatologia está associada à fibrose intersticial.⁷²

Estudo recente realizado em modelo experimental de lesão renal aguda, demonstrou que a administração das iPS pode ter um papel relevante no restabelecimento da integridade das células tubulares renais e contribuir com o processo de reparação renal. Esses efeitos parecem ser mediados por enzimas anti-oxidativas e pelo efeito citoprotetor parácrino das iPS.⁷³ Da mesma forma, os mecanismos envolvidos na redução da PT24h poderiam ser consequência da regeneração celular e liberação de fatores parácrinos pelas células iPS no tecido renal lesado.⁷³

Assim como outros pesquisadores, nosso grupo também relatou que a administração de CTMs melhora a função renal e retarda a progressão da IRC em ratos submetidos a nefrectomia 5/6, reduzindo a inflamação e a injúria do tecido renal e consequentemente também a fibrose.^{4,44,70} Aparentemente, a melhora da função renal após o tratamento com CT se deve a vários fatores atuando em um microambiente apropriado para o reparo renal. Entre esses fatores estão a produção de citocinas anti-inflamatórias e os fatores de crescimento que podem contribuir para a regeneração

renal. Essa hipótese é corroborada pelos nossos dados de imuno-histoquímica que mostram redução dos marcadores inflamatórios PCNA e CD68 (macrófagos) em ambos os grupos tratados. Também houve uma redução significativa do TGF- β , apenas no grupo CTM, possivelmente pela diminuição do processo de fibrose, o que pode ter colaborado para atenuar a progressão da IRC.

A análise molecular detectou aumento da expressão do VEGF em ambos grupos tratados, provavelmente devido à ação neoangiogênica das CT, confirmada por uma série de estudos que indicam a elevada capacidade destas células de secretarem fatores bioativos envolvidos no processo de formação de novos vasos, especialmente pelo processo de angiogênese.⁷⁴⁻⁷⁵

Com relação a análise histológica, nossos dados demonstraram um efeito protetor das CTM e iPS sobre a glomeruloesclerose (79% menos glomeruloesclerose) quando comparados ao grupo CRF5/6. Esses resultados corroboram os dados de Cavaglieri e cols que utilizaram o mesmo modelo de nefrectomia 5/6.¹³

Os ratos tratados com CTM tiveram melhor desfecho que aqueles que receberam iPS e uma possível explicação para essa diferença poderia ser a formação de “tumores” que danificaram o parênquima renal em 5 dos 8 animais e comprometeram a função renal. Uma observação curiosa que necessita mais esclarecimentos foi o fato do gene SRY ser detectado somente nos 5/8 ratos (62,5%) que receberam tratamento com iPS e que apresentaram a formação de tumores.

Um fato relatado pela literatura, é a possibilidade de formação de tumores *in vivo* associados com as células iPS. Além do teratoma, essas células podem formar outros tipos de tumores malignos.⁷⁶⁻⁷⁷ Embora as iPS possuam propriedades de auto-renovação e pluripotência, importantes para sua utilização no tratamento de várias

doenças, elas podem dar origem a tumores com grandes riscos para a utilização na prática clínica.⁷⁷ Recentemente, Riggs et al (2013) avaliaram a semelhança entre iPS e formação de tumores em fibroblastos e constataram que, apesar de tipos celulares diferentes, os processos de indução de pluripotência e de formação de tumores eram semelhantes, reforçando a associação existente entre pluripotência e tumorigênese.⁷⁸

Embora o uso de células iPS seja muito promissor para a medicina regenerativa, há muitos aspectos dessa tecnologia que precisam ser melhorados e testados antes da aplicação clínica tornar-se uma realidade.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

1- A modificação genética de fibroblastos de ratos com vetores lentivirais contendo os quatro fatores de transcrição OCT-4, C-MYC, KLF-4 e SOX-2 permitiu a reprogramação em células iPS.

2- O tratamento da IRC experimental com células CTM e iPS retardou a progressão da doença renal crônica e melhorou alguns parâmetros da morfologia renal.

3- Houve a formação de “tumores” no grupo tratado com iPS e por isso sugerimos cautela na interpretação desses resultados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romão JER, Pinto JE, Canziani SWL, Canziani ME, Praxedes JN, Santello J L, et al. Censo SBN 2002: Informações epidemiológicas das unidades de diálise do Brasil. *J Bras Nefrol.* 2003;25:188-199.
2. Wang WW, Wang W, Jiang Y, Han GF, Lu S, Li G, et al. Reprogramming of mouse renal tubular epithelial cells to induced Pluripotent stem cells. *Cytotherapy*, 2013;15:578-585.
3. Faa G, Sanna A, Gerosa C, Fanni D, Puddu M, Ottonello G, et al. Renal physiological medicine to prevent chronic renal failure: Should we start at birth? *Clinica Chimica.* 2015; 156-162.
4. Caldas HC, Fernandes IM, Gerbi F, Souza AC, Baptista MA, Ramalho HJ, et al. Effect of whole bone marrow cell infusion in the progression of experimental chronic renal failure. *Transplant Proc.* 2008;40:853-855.
5. Viana RH, Soares CMBM, Tavares MS. Inflamação da Doença Renal Crônica: o papel das citocinas. *J Bras Nefrol.* 2011; 3: 351-364.
6. Bregman R, Fisiopatologia da progressão da Insuficiência Renal Crônica. *J Bras Nefrol.* 1992;14:89-95.
7. Sociedade Brasileira de Nefrologia – Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2014. Publicado no *J Bras de Nefrol.* 2014;30:233-238.
8. Khwaja A, Throssell D. A Critique of the UK NICE Guidance for the Detection and Management of Individuals with Chronic Kidney Disease. *Nephron Clin Pract.* 2009;113:207-213.
9. Y.-H. Chou, S.-Y. Pan, C.-H. Yang, S.-L. Lin. Stem cells and kidney regeneration. *J Formos Med Assoc.* 2014;113: 201–209.
10. Semedo P, Correa-Costa M, Cenedeze MA, Malheiros DMAC, dos Reis MA, Shimizu MH, et al. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells.* 2009;27:3063-3073.
11. Hosteter TH. Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Physiol* 1995; 57:263-78.
12. Kliem V, Jhonson RJ, Alpres CE, Yoshimura A, Couser WG, Koch KM, et al.

- Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Int.* 1996;49:666-78.
13. Cavaglieri RC, Martini D, Sogayar MC, Noronha IL. Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model. *Transp Proc.* 2009;41:947-951.
 14. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* 2000;287:1427-30.
 15. Jaenisch R, Young R. Stem Cell, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell.* 2008;132:567-582.
 16. Mollura DJ, Hare MJ, Rabb H. Stem-Cell therapy for renal disease. *American Journal of kidney disease.* 2003;42:891-905.
 17. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:7634-7638.
 18. Weissman, I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science.* 2000;287:1442-1446.
 19. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 2001;19:193-204.
 20. Yokote S, Yokoo T. Stem Cell in kidney regeneration. *Current Medicinal Chemistry.* 2012;19:6009-6017.
 21. Osafune, K. In vitro regeneration of kidney from pluripotent stem cells. *Exp Cell. Res.* 2010;316:2571-2577.
 22. Yokote S, Yamanaka S, Yokoo T. *De novo* kidney Regeneration with stem cells. *Journ Biomed and Biothec.* 2012;19:6009-6017.
 23. Caldas, HC, Hayashi APC, Abbu-Filho M. Repairing the chronic damage kidney: The role of regenerative Medicine. *Transp Proceedings.* 2011;43:3573-3576.
 24. Semedo P, Corrêa-Costa M, Cenedeze MA, Malheiros DMAC, dos Reis MA, Shimizu MH, et al. Immunosuppressive and remodelling properties of mesenchymal stem cell in a model of chronic kidney disease. *Stem Cell* 2009;7:469-479.
 25. Li H, Guo Z, Jiang X, Zhu H, Li X, Mao N. Mesenchymal stem cells alter

- migratory property of T dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease. *Stem Cell*. 2008; 26:2531-2541.
26. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. e Hemoter*. 2009; 31: 25-35.
27. Reinders MAJ, Fibbe W, Rabelink TJ. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25:17-24.
28. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131:861-872.
29. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663–676.
30. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007; 1:55-70.
31. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448:313–318.
32. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448:318–324.
33. Woltjen K, Iacovos PM, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, et al. piggyback transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 458:766-70.
34. Morizane R, Monkawa T, Itoh H. Differentiation of murine embryonic stem and induced pluripotent stem cells to renal lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 1334–1339.
35. Rossant J. Stem cells: The magic brew. 2007. *Nature* 448:260-262
36. Moslem M, Eberle I, Weber I, Henschler R, Cantz T. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Support CD34(pos) Hematopoietic Stem Cell Propagation and Suppress Inflammatory

- Reaction. *Stem Cells Int.* 2015;2015:15.
37. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 474: 212-215.
 38. Muraro MJ, Kempe H, Verschure PJ. Concise review: the dynamics of induced pluripotency and its behavior captured in gene network motifs. *Stem Cells.* 2013;31:838-48.
 39. Hotta A, Ellis J. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: An epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *J Cell Biochem.* 2008;105:940-948.
 40. Fussner E, Djuric U, Strauss M. Constitutive heterochromatin reorganization during somatic cell reprogramming. *EMBO J.* 2011;30:1778–1789.
 41. Patel M, Yang S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev.* 2010; 6:367–80.
 42. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science.* 2007;318:1917-1920.
 43. Xu Y, Wei X, Wang M, Zhang R, Fu Y, Xing M, et al. Proliferation rate of somatic cells affects reprogramming efficiency. *J Biol Chem.* 2013;288:9767-9778.
 44. Caldas HC, Fernandes IM, Kawasaki-Oyama RS, Baptista MA, Plepis AM, Martins VA, et al. Effect of stem cells seeded onto biomaterial on the progression of experimental chronic kidney disease. *Exp Biol Med.* 2011;236:746-54.
 45. Li B, Morioka T, Uchiyama M, Oite T. Bone marrow cell infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat model. *Kidney Int.* 2006; 69:323–330
 46. Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy.* 2014;2015: 1-18
 47. Mani SA, Guo W, Liao Mai-Jing, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133:704-715.

48. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139:897-990.
49. Semedo P, Donizetti-Oliveira C, Burgos-Silva M, [Cenedeze MA](#), [Malheiros DMAC](#), [Pacheco-Silva A](#), et al. Bone marrow mononuclear cells attenuate fibrosis development after severe acute kidney injury. *Lab Invest*. 2010;90:685-695.
50. Wynn T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008; 214: 199–210.
51. Wu HJ, Yiu WH, Li RX, Wong DW, Leung JC, Chan LY, et al. Mesenchymal stem cells modulate albumin-induced renal tubular inflammation and fibrosis. *PLoS One*. 2014;9:e90883.
52. Banon-Maneus E, Rovira j, Ramirez-Bajo MJ, Moya-Rull D, Hierro-Garcia N, Takenaka S, et al. Wnt Pathway Activation in long term remnant rat model. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 324713.
53. Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnasah S, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol*. 2001;195:229–235.
54. Li Y, Wingert RA, Regenerative medicine for the kidney: stem cell prospective & challenges. *Clin Transl Med*. 2013;2:1326-30.
55. Fujihara CK, Noronha IL, Malheiros DMA, Antunes GR, de Oliveira IB, Zatz R. Combined mycophenolate mofetil and losartan therapy arrest established injury in the remnant kidney. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:283-286.
56. Kujal P, Vernerová Z. [5/6 nephrectomy as an experimental model of chronic renal failure and adaptation to reduced nephron number] *Cesk Fysiol*. 2008; 57:104-9.
57. Choi S, Park M, Kim J, Hwang S, Park S, Lee Y. The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of chronic renal failure. *Stem Cells Dev*. 2009;18:521-529.
58. Song B, Niclis JC, Alikhan MA, Sakkal S, Sylvain A, Kerr PG, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human kidney mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:1213-1220.

59. Wen-Ching S, Yu-Hsiang C, Shuei-Liong L. Enthusiasm for induced pluripotent stem cell-based therapies in kidney regeneration. *J of the Formosan Med Assoc* 2014; 2014:1-2.
60. Lee PI, Lin HH, Jiang ST, Lu PJ, Chou KJ, Fang HC, et al. Mouse kidney progenitor cells accelerate renal regeneration and prolong survival after ischemic injury. *Stem Cell* 2010; 28:573-584.
61. De Broe ME. Tubular regeneration and the role of bone marrow cells: 'stem cell therapy'—a panacea? *Nephrol DialTransplant*. 2005;20:2318–2320.
62. Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2625 –2635.
63. Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008;134:877–886.
64. Zhou T, Benda C, Duzinger S, Huang Y, Li X, Li Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from urine. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:1221-1228.
65. Rais Y, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukovet S, et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* 2013; 502:65-70.
66. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-147.
67. Guha P, Morgan JW, Mostoslavsky G, Rodrigues NP, Boyd AS. Lack of Immune Response to Differentiated Cells Derived from Syngeneic Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12:407-12.
68. Veniant M, Heudes D, Clozel JP, Bruneval P, Ménard J. Calcium blockade versus ACE inhibition in clipped and unclipped kidneys of 2K-1C rats. *Kidney Int* 1994; 46:421–429.
69. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001; 25:402–8
70. Caldas HC, de Paula Couto TA, Fernandes IM, Baptista MA, Kawasaki-Oyama RS, et al. Comparative effects of mesenchymal stem cell therapy in distinct stages of chronic renal failure. *Clin Exp Nephrol*. 2015; Jan 29.

-
71. Chin MH¹, Pellegrini M, Plath K, Lowry WE. Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7:263-269.
72. Schwartzman M, Reginensi A, Wong JS, Basgen JM, Meliambro K, Nicholas SB, et al. Podocyte-Specific Deletion of Yes-Associated Protein Causes FSGS and Progressive Renal Failure. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:pii: ASN.2014090916. [Epub ahead of print]
73. Tarng DC, Tseng WC, Lee PY, Chiou SH, Hsieh SL. Induced Pluripotent Stem Cell-derived Conditioned Medium Attenuates Acute Kidney Injury by Downregulating the Oxidative Stress-Related Pathway in Ischemia-Reperfusion Rats. *Cell Transplant*. 2015; 30. [Epub ahead of print]
74. Abburi C1, Prabhakar S, Kalra J, Huria A, Anand A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induced proliferation of human fetal derived ciliary epithelium stem cells is mediated by jagged-N cadherin pathway. *Curr Neurovasc Res*. 2013; 10:93-102.
75. Chaudhury H1, Raborn E, Goldie LC, Hirschi KK. Stem cell-derived vascular endothelial cells and their potential application in regenerative medicine. *Cells Tissues Organs*. 2012; 195:41-47.
76. Tung PY, Knoepfler PS. Epigenetic mechanisms of tumorigenicity manifesting in stem cells. *Oncogene*. 2015; 34:2288-2296.
77. Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells*. 2009; 27:1050-1056.
78. Riggs JW, Barrilleaux BL, Varlakhanova N, Bush KM, Chan V, Knoepfler PS. Induced pluripotency and oncogenic transformation are related processes. *Stem Cells Dev*. 2013; 22:37-50.

Anexo 1.

Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal.



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

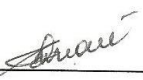
FAMERP Autarquia Estadual, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090.000 Tel. 3201-5700 S.J.Rio Preto/

DELIBERAÇÃO CEUA Nº 013/2012

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEUA/FAMERP, em reunião desta data, analisou o projeto intitulado **“Efeito das células-tronco pluripotentes induzidas (IPS) no tratamento de insuficiência renal crônica experimental” (Protocolo FAMERP nº 6852/2012)**, sob responsabilidade do Prof. Dr. Mário Abbud Filho, e deliberou que o mesmo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 e foi **aprovado** por essa Comissão.

Atenção: **Até 30 dias após a finalização do projeto**, o pesquisador deverá preencher o Formulário do Relatório Final disponível no site e enviar ao CEUA. O descumprimento desta obrigação poderá prejudicar o andamento de futuras solicitações.

São José do Rio Preto, 22 de Novembro de 2012.



Prof. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari

Presidente da CEUA

FAMERP

