
Ciências Biológicas Integral

Priscilla Barbosa Costa

PAPEL REPARADOR E IMUNOMODULADOR DAS
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMs)
DEFICIENTES DE RECEPTOR PARA
INTERFERON-GAMMA(IFN γ) EM MODELOS
RENAIS AGUDOS

Priscilla Barbosa Costa

PAPEL REPARADOR E IMUNOMODULADOR DAS CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS (CTMs) DEFICIENTES DE RECEPTOR
PARA INTERFERON-GAMMA(IFN γ) EM MODELOS RENAIIS
AGUDOS

Orientador: Dr^a. Patricia Semedo

Co-orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Supervisor: Prof^a. Dr^a. Doralice Maria Cella

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharel e Licenciado em Ciências
Biológicas.

Rio Claro
2011

574.29 Barbosa-Costa, Priscilla
B239p Papel reparador e imunomodulador das células-tronco mesenquimais (CTMs) deficientes de receptor para interferon-gamma (IFN γ) em modelos renais agudos / Priscilla Barbosa-Costa. - Rio Claro : [s.n.], 2011
49 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências Biológicas Integral) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Patricia Semedo
Co-Orientador: Niels Olsen Saraiva Câmara

1. Imunologia. 2. Células-tronco adiposas. 3. Citocinas. 4. Lesão renal aguda. 6. Nefrologia. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

SUMÁRIO

	Páginas
1. Resumo	2
2. Introdução	3
2.1 Insuficiência Renal Aguda	3
2.2 Células-Tronco Mesenquimais (CTM)	8
2.3 Papel Imunossupressor das CTMs	13
3. Justificativa	16
4. Objetivo	17
5. Materiais e Métodos	18
6. Resultados	25
7. Discussão	37
8. Conclusão	42
9. Referências Bibliográficas	43

1. Resumo

A insuficiência renal aguda (IRA) é uma patologia que apresenta alta incidência na população e elevada morbimortalidade. Apesar de todos os avanços terapêuticos já obtidos, essas taxas ainda continuam elevadas. Uma possível alternativa, atualmente sugerida, seria o transplante de células-tronco. O processo regenerativo das células-tronco mesenquimais (CTMs) já foi demonstrado em diversos modelos experimentais e em alguns ensaios clínicos. O mecanismo de ação mais sugerido é a ação parácrina das CTMs na área lesada. Ainda, sabe-se que nesse ambiente, citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN γ , ativam as CTMs para seu papel reparador. O presente estudo busca analisar o papel do IFN γ na ativação das CTMs em modelos renais. As CTMs de animais nocautes para receptor de IFN γ (IFN γ R KO) e de animais selvagens (controle/ C57/Bl6) foram isoladas do tecido adiposo. Essas células foram caracterizadas por imunofenotipagem e diferenciação em adipócitos e osteócitos. A lesão renal aguda foi obtida através do clampeamento dos pedículos renais de camundongos machos C57/Bl6, por 45 min. Após 4hs da lesão isquêmica, as CTMs IFN γ R KO e CTMs controles foram administradas intraperitonealmente, e 24hs após a cirurgia os animais foram sacrificados. O tratamento com CTMs selvagens apresentou significativa redução dos níveis de uréia e creatinina sérica. No entanto, a redução desses níveis séricos com CTMs IFN γ R KO foi menos intensa. Com relação à análise da resposta inflamatória do rim, os dados demonstram que a expressão de RNAm de IL-6 é maior nos animais tratados com CTMs IFN γ R KO quando comparada ao tratamento com CTMs selvagens; porém, os dois tratamentos apresentam expressão reduzida em comparação aos animais não tratados. Já a expressão de RNAm de IL-10 é maior em animais tratados com CTMs em comparação aos não tratados, e em relação aos tratados com CTMs IFN γ KO. Ainda, os animais tratados com CTMs selvagens apresentam maiores índices de necrose tubular aguda e regeneração tecidual quando comparados aos animais tratados com CTMs IFN γ R KO. Estudos *in vitro* demonstraram que as CTMs IFN γ R tem menor capacidade proliferativa do que as CTMs selvagens. Nota-se que os animais tratados com CTMs IFN γ R KO apresentam uma pequena melhora dos sintomas de IRA, portanto a presença de receptor de IFN γ não é essencial para a reparação do tecido, mas a capacidade reparadora, via imunomodulação, é reduzida. Mais pesquisas são necessárias para uma melhor compreensão do papel do receptor de IFN para ativação e resposta das CTMs e sua implicação na terapia celular. Comitê de ética - 0635/10.

Palavras-chave: Células-tronco adiposas; Citocinas; Imunologia; Lesão renal aguda; Nefrologia.

2. Introdução

2.1 Insuficiência Renal Aguda

A súbita perda da função renal resulta na falha do rim ao excretar resíduos nitrogenados e manter a homeostase de fluidos e eletrólitos. O acúmulo de substâncias nitrogenadas, como uréia e creatinina, no sangue, com redução ou não da diurese é o que caracteriza a insuficiência renal aguda (IRA) (Thadhani, Pascual et al. 1996).

A IRA pode ser ocasionada pela redução da perfusão renal sem lesão celular (I); por um insulto isquêmico, tóxico ou obstrutivo do túbulo renal (II); por um processo túbulo-intersticial com inflamação e edema (III); ou por uma diminuição da capacidade de filtração por uma patologia primária dos glomérulos (IV) (Thadhani, Pascual et al. 1996).

A IRA é classificada em pré-renal, renal e pós-renal. Na IRA pré-renal, há redução da depuração plasmática (*clearance*) por fatores que limitam a perfusão renal sem lesão celular, mantendo, assim, intactas as funções glomerular e tubular. Dessa forma, qualquer condição que reduza o fluxo renal efetivo pode desencadear a IRA pré-renal, como por exemplo, doença de grandes (estenose da artéria renal) e pequenos vasos (vasculites), depleção do volume intravascular com hipotensão, sepse, diminuição do volume circulante efetivo (como por exemplo, insuficiência cardíaca), e drogas (contrastes iodados, ciclosporina). É uma patologia reversível se a causa subjacente for corrigida. A IRA pós-renal está relacionada à obstrução do fluxo urinário. A IRA renal é denominada de intrínseca, sendo classificada de acordo com o local primário da lesão: tubular, interstício, vasos e, glomerular. A insuficiência pré-renal e a renal por isquemia ou nefrotoxinas, são responsáveis pela maior parte dos casos de IRA (Thadhani, Pascual et al. 1996).

A IRA pré-renal sustentada é a causa mais comum de necrose tubular induzida por isquemia (Thadhani, Pascual et al. 1996). Um dos principais fatores etiológicos de IRA é a lesão de isquemia e reperfusão (I/R) em rins nativos ou transplantados. A lesão de I/R é um fenômeno complexo que induz ao dano celular por um processo bifásico: a isquemia e posteriormente a reperfusão (Liano and Pascual 1996; Thadhani, Pascual et al. 1996; DuBose, Warnock et al. 1997; Paller 1998).

Atualmente, o termo IRA foi alterado numa tentativa de abranger com maior amplitude todas as alterações decorrentes dessa lesão renal. Foi proposto pela AKIN (Acute Kidney Injury Network) uma nova nomenclatura - a Lesão Renal Aguda (LRA), que reflete o espectro inteiro de IRA, reconhecendo que um declínio agudo na função renal é

freqüentemente secundário a uma lesão que causa mudanças funcionais e estruturais ao rim (Mehta, Kellum et al. 2007).

Recentemente, a definição de LRA é dada pelo RIFLE. RIFLE é um consenso definido internacionalmente, que se baseia em 3 graus de gravidade: risco (*risk* - classe R), lesão (*injury* - classe I) e insuficiência (*failure* - classe F) e dois de complicações: perda (*loss* - classe L) e estágio final da doença renal (*end-stage kidney disease* - classe E) (Hoste, Clermont et al. 2006) (Veja tabela abaixo). A IRA/LRA definida pela classificação de RIFLE ocorre em 2/3 dos pacientes em UTI.

Tabela I: Critérios para a definição da Lesão Renal Aguda (LRA) de acordo com a classificação RIFLE (HOSTE, CLERMONT ET AL. 2006; KELLUM 2008).

Classe	Taxa de Filtração Glomerular (TGF)	Volume de Urina
R – risco	Creatinina Sérica $\times 1.5$ ou diminuição da TFG em 25%	$< 0.5 \text{ ml/kg/hora} \times 6 \text{ horas}$
I – lesão	Creatinina Sérica $\times 2$ ou diminuição da TFG em 50%	$< 0.5 \text{ ml/kg/hora} \times 12 \text{ horas}$
F – insuficiência	Creatinina Sérica $\times 3$, ou diminuição da TFG em 75% , ou creatinina sérica $\geq 4 \text{ mg/dl}$, com um aumento agudo $> 0.5 \text{ mg/dl}$	$< 0.3 \text{ ml/kg/hora} \times 24 \text{ horas}$, ou anúria $\times 12 \text{ horas}$
L – perda	Insuficiência renal aguda persistente = perda da função renal $> 4 \text{ semanas}$	
E – estágio final	Estágio final da doença renal $> 3 \text{ meses}$	

Nessa monografia, serão utilizados IRA e LRA para denominar essa patologia.

Os conhecimentos referentes ao mecanismo da lesão de isquemia renal advêm, basicamente, dos estudos sobre a patogênese da IRA. A pesquisa vem contribuindo muito para a área básica, auxiliando na exploração dos mecanismos patogénéticos e na avaliação de potenciais intervenções terapêuticas (Brezis and Epstein 1993; Lieberthal 1997).

Estudos realizados através de micropunção demonstraram que a lesão da célula tubular promove o comprometimento da filtração glomerular, devido à obstrução da luz tubular, o que

gera retrodifusão do filtrado glomerular. Dessa forma, a passagem de soluto e água ocorre sem regulação, da luz tubular para o interstício e, de volta para os capilares venosos e veias arteriais (Myers and Moran 1986; Bonventre 1993; Lieberthal 1997). Na maior parte das vezes, a obstrução tubular é decorrente da formação intraluminal, de cilindros proteináceos, que frequentemente contêm células ou debris de células tubulares (Lieberthal 1997). A perda de células tubulares ou o destacamento de células ainda viáveis, acarretando no desnudamento da membrana tubular, também é uma causa de retrodifusão do filtrado, visto que permite a livre passagem do filtrado (Kroshian, Sheridan et al. 1994).

Com relação à resposta do rim à hipóxia sabe-se que esta é heterogênea. As porções do néfron mais susceptíveis são a porção reta do túbulo contorcido proximal (TCP) segmento 3 (S3), seguida da porção espessa da alça de Henle (AHE). Essa susceptibilidade é explicada devido ao fato de que esses segmentos desempenham alta atividade metabólica e não dispõem de mecanismos capazes de reduzir a atividade de transporte ativo (Brezis and Epstein 1993; Lieberthal 1997).

Nos modelos experimentais e na IRA é observado aumento da resistência vascular total e redução de 40-50% do fluxo sanguíneo renal. Essas alterações hemodinâmicas representam um importante papel na patogênese da IRA, em que o predomínio de vasoconstrição leva a alterações regionais do fluxo sanguíneo renal que prejudicam a oferta de oxigênio, principalmente, na medula externa (Molitoris 1993).

A IRA apresenta altas taxas de morbimortalidade, e chega a acometer até 70% dos pacientes criticamente doentes. De 4-5% dos pacientes internados nas unidades de terapia intensiva (UTI) recebem tratamento para a IRA (Wen, Murugan et al. 2010).

São diversas as alterações celulares que acompanham a IRA. As alterações mais proeminentes ocorrem nas células tubulares proximais renais, que compõem o túbulo contorcido proximal renal; esses apresentam formato irregular, e estão, totalmente, situados no córtex renal. As células tubulares proximais são células prismáticas e cilíndricas, que exibem microvilosidades em seus polos apicais. No lúmen do túbulo contorcido proximal, o conjunto de microvilosidades forma a borda de escova; esta tem a capacidade de aumentar a área e superfície tubular, e com isto possibilita o aumento da capacidade de absorção no túbulo, já que além das células tubulares apresentarem uma grande quantidade de mitocôndrias para sustentar os vigorosos processos de transporte ativo, e também possuem nas microvilosidades, moléculas protéicas transportadoras, que possibilitam o mecanismo de co-transporte de sódio ligado a múltiplos nutrientes orgânicos, como por exemplo, os

aminoácidos e a glicose, e o mecanismo de contra transporte, que reabsorvem sódio dos túbulos renais e secretam na luz do túbulo íons de hidrogênio e de potássio. Os túbulos contorcidos proximais fazem a reabsorção maciça do filtrado glomerular, liberando para a porção descendente da alça de Henle 40 % do volume que penetrou na cápsula de Bowman (Netter, 1973; Aires, 1999; Cassola, 2000; Douglas, 2002; Guyton, 2002; Delamarche, 2006).

Após um evento lesivo, é possível observar alterações morfológicas nas células tubulares proximais ocasionadas pela isquemia, como a perda da borda em escova da membrana apical das células do túbulo proximal. As células do túbulo proximal deixam de apresentar polaridade e a integridade de suas “tight junctions” é quebrada, devido, possivelmente, as alterações na actina e redes de microtúbulos do citoesqueleto, o que acarreta na passagem livre de água e solutos por entre as células. Outra alteração é a diminuição de sódio e do transporte vetorial de sódio-acoplado, ocasionado pela redistribuição de Na^+/K^+ - ATPase na membrana basolateral apical. Além disso, as integrinas são redistribuídas, passando a serem expressas na superfície apical do epitélio ao invés da superfície basal, e as células mortas e vivas são destacadas dirigindo-se para o lúmen tubular (figura 1). Esses fenômenos acarretam no aumento da pressão tubular e redução da taxa de filtração glomerular. A redução da taxa de filtração glomerular é resultado do vazamento do filtrado glomerular, devido à perda da barreira epitelial e das “tight junctions” entre as células viáveis (Thadhani, Pascual et al. 1996; Bonventre and Zuk 2004).

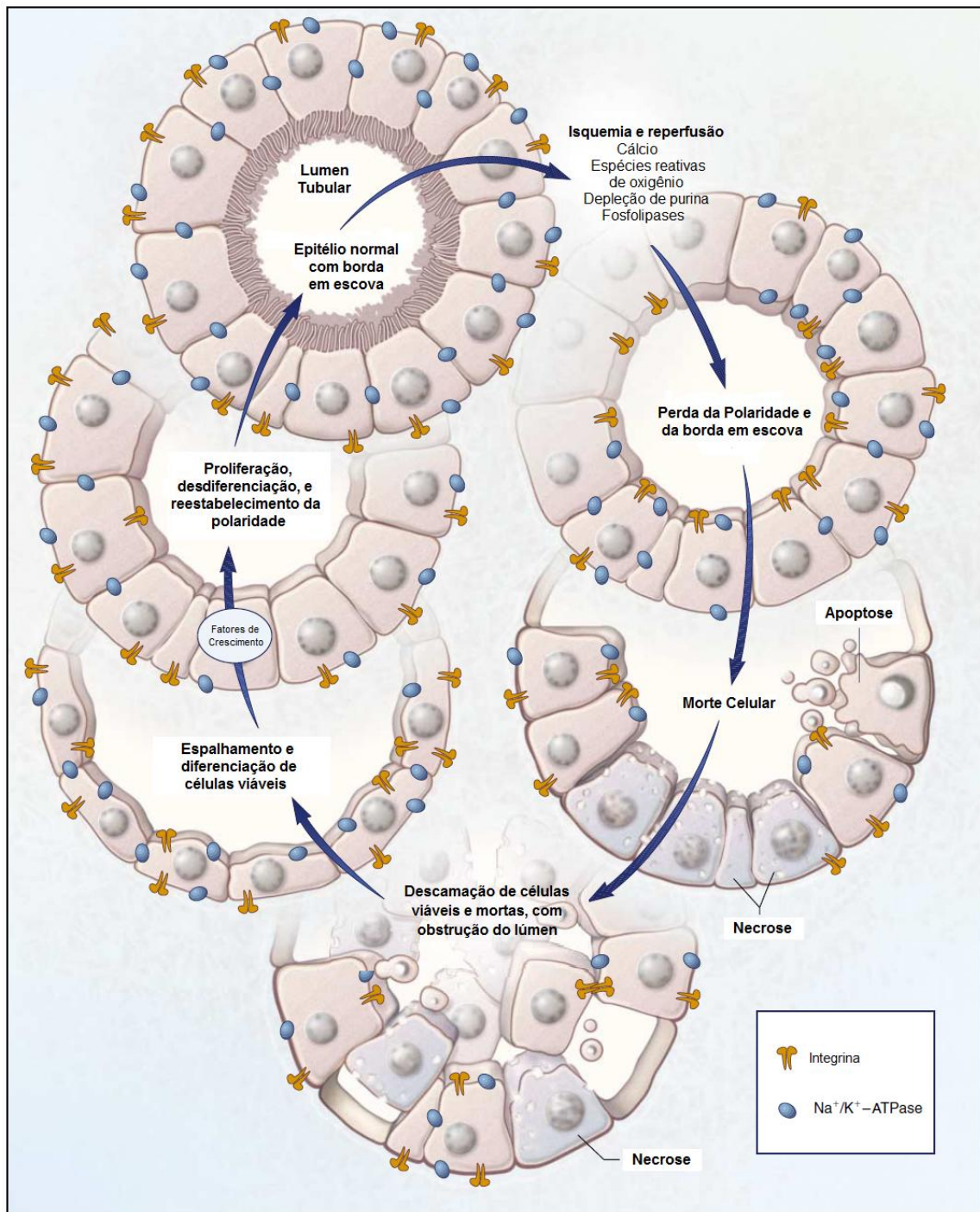


Figura 1. Lesão e reparo da célula tubular proximal na Insuficiência Renal Aguda e Isquêmica.

A isquemia acarreta em alterações morfológicas nos túbulos proximais do tecido renal; dentre elas é possível observar a perda da borda em escova, perda de polaridade, e redistribuição de integrinas e $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ na superfície apical do túbulo. O cálcio, as espécies reativas de oxigênio, a depleção das purinas, e fosfolipases apresentam importante papel nestas alterações morfológicas e da polaridade da célula, assim como na subsequente morte celular consequência da necrose e apoptose celular. A descamação de células viáveis e inviáveis para o lúmen tubular resulta na obstrução do lúmen, contribuindo, assim, para a redução na taxa de filtração glomerular. O rim severamente danificado pode restaurar completamente sua estrutura e função, através do espalhamento e da desdiferenciação de células viáveis que podem ocorrer durante a recuperação do tecido. Os fatores de crescimento, possivelmente, contribuem para a restauração do epitélio tubular. Figura adaptada de Thadhani, R., M. Pascual, et al. 1996.

A patogênese da lesão renal aguda é complexa e ainda não totalmente esclarecida. Além das alterações morfológicas, a resposta inflamatória (Bonventre and Zuk 2004; Pinheiro, Camara et al. 2007; Thurman 2007) é atualmente aceita como um importante componente patogênico, assim como outros fatores, tais como: a lesão do endotélio, as espécies reativas de oxigênio (Tondreau, Meuleman et al. 2005) tais como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons hidroxil ($OH^{\bullet}$), a produção de espécies de nitrogênio (ERN) e a produção de mediadores pelas células tubulares danificadas sub-letalmente (Willinger, Schramek et al. 1992; Scannell 1996).

A isquemia, e consequente, reperfusão induz alterações nos leucócitos, nas células endoteliais e nas células epiteliais tubulares, que resultam na inflamação renal. As células derivadas da medula óssea, tais como células Natural killer T (NKT), neutrófilos e macrófagos passam a acumular nos rins. Essas células se ativam e começam a sintetizar citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, o $IFN\gamma$ que é produzido por neutrófilos e células NKT. O dano causado nas células endoteliais irá facilitar o acúmulo de leucócitos no rim, devido ao aumento da permeabilidade vascular e expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 e fractalina. As células dendríticas residentes no rim são ativadas e passam a produzir quimiocinas e citocinas. Ocorre também infiltração de macrófagos, células B e células T. As células epiteliais tubulares do tecido renal aumentam a expressão de toll-like receptors (TLRs), os quais medeiam à produção de citocinas e quimiocinas nos rins feridos. Mudanças em cada tipo de célula influenciam direta ou indiretamente em outras células envolvidas promovendo a inflamação renal após a Isquemia e Reperfusão (I/R) (Kinsey, Li et al. 2008; Akcay, Nguyen et al. 2009; Wen, Murugan et al. 2010).

Tento isso em vista, a comunidade científica vem buscando novas perspectivas terapêuticas em modelos experimentais para uma futura utilização no tratamento de seres humanos. Uma alternativa seria o transplante de células-tronco (CT), pois estas têm a capacidade reparadora, em especial pela capacidade imunorreguladora, demonstrada em modelos experimentais em vários órgãos.

2.2 Células-Tronco Mesenquimais (CTM)

Atualmente, CT é definida como uma célula primitiva que se mantém em um estado indiferenciado e possui a propriedade de se dividir assimetricamente, gerando uma célula-filha semelhante a ela (autorrenovação) e outra célula-filha em um estado diferenciado (renovação do tecido) (Figura 2) (Moitra, Lou et al. 2011). Essa capacidade de se dividir e gerar células-filhas diferentes deve-se ao fato que durante a divisão assimétrica a separação

citoplasmática ocorre de forma diferenciada gerando, assim, uma célula idêntica a original (CT), que se expandirá clonogenicamente, e outra célula progenitora comprometida com uma linhagem específica. Tal processo, também ocorre na oogênese, na espermatogênese e no desenvolvimento do zigoto, durante as primeiras divisões (Ramalho-Santos and Willenbring 2007).

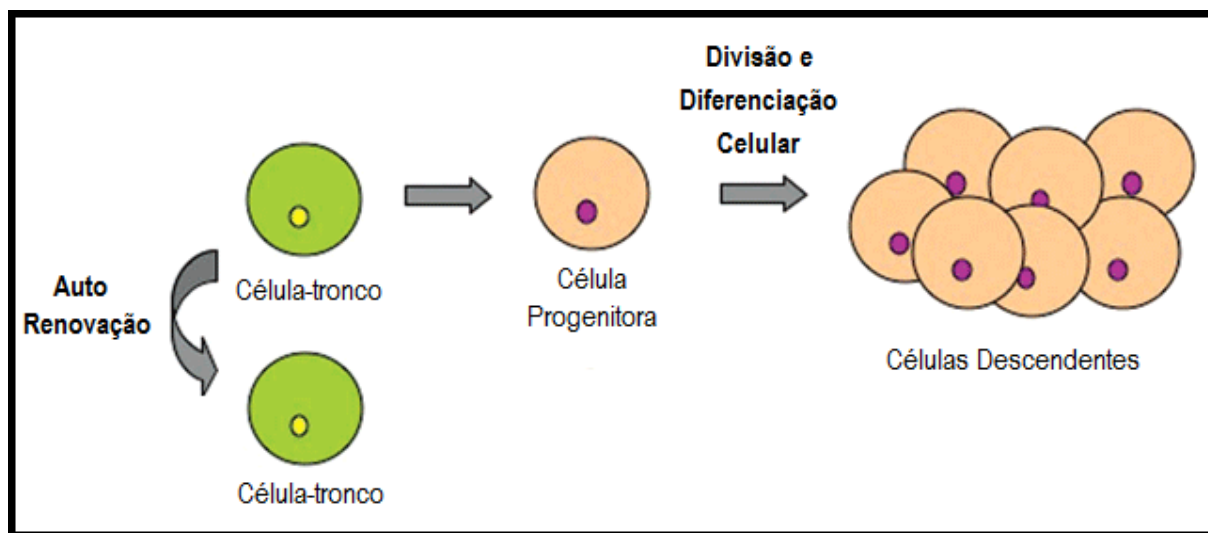


Figura 2. Divisão assimétrica em células-tronco.

Divisão assimétrica em uma célula-tronco normal. A CT pode se autorrenovar para dar origem a outra CT (verde), mas também pode se dividir formando uma célula progenitora (rosa). Nessa figura é possível observar as duas propriedades que definem as CTs, a propriedade de autorrenovação, na qual a CT ao se dividir gera uma célula-filha semelhante a célula-mãe; e a propriedade de potencialidade, na qual uma CT ao se dividir consegue gerar células-filhas bem diferentes da célula-mãe. Figura adaptada de Moitra, K., H. Lou, et al. 2011.

Existem dois tipos de CTs: as embrionárias (CTEs) e as adultas (CTAs). Esses dois tipos de células diferem-se devido à origem, e principalmente, no conceito de potencialidade. Potencialidade é definida como a capacidade das CT em gerar células-filhas diferentes, de acordo com o folheto germinativo. Em princípio, CTEs possuem maior potencialidade que as CTAs, pois conseguem originar células-filha dos três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma) (Denker 2006).

Com relação à gradação de potencialidade, têm-se CTs:

- Totipotentes: são as CTs que podem dar origem a um novo organismo, como é o caso de células do zigoto;
- Pluripotentes: são as células que podem dar origem às células dos três folhetos germinativos, como as CTE;

- Multipotentes: já possuem certo grau de especialização, que as permite apenas gerar células de um folheto germinativo, como as CTA mesenquimais (da medula óssea); e
- Unipotente ou progenitora: são células que produzem um único tipo celular que mantém a capacidade de autorreplicação, o que a distingue de uma célula não-tronco, como as CTA residentes em órgãos (Denker 2006).

As CTAs podem ser encontradas em todos os órgãos, sendo responsáveis pela manutenção da homeostase e integridade do tecido. Essas células são multipotentes, ou seja, apresentam a capacidade de se dividir, originando células de apenas um folheto germinativo, como por exemplo, uma CTA encontrada no cérebro, só poderá se diferenciar e dar origem a células da ectoderme.

Para que as CTAs se mantenham quiescentes no tecido, estas ficam localizadas em nichos (Moore and Lemischka 2006). Essa região específica do tecido, durante o desenvolvimento humano, irá sustentar e regular a proliferação das CTAs; isso ocorrerá através das outras células presentes no nicho; essas células irão gerar um abrigo para as CTs impedindo que elas sofram diferenciação, estímulos apoptóticos ou qualquer outro estímulo que as levem a diferenciação. Outra função do nicho é a prevenção da excessiva produção de CTs, que poderia resultar em câncer (Moore and Lemischka 2006; Sujata and Chaudhuri 2008).

Quando ocorre uma lesão no tecido, as CTAs presentes nos nichos recebem sinais do meio ambiente (quimiocinas), ativam-se e migram para o local lesado. Sabe-se que tecidos lesados produzem uma série de quimiocinas, que atraem para a região células inflamatórias e células-tronco adultas. Desse modo, acredita-se que o papel das CTAs seja a regeneração tecidual após a lesão, mantendo a homeostase do tecido, e ainda, que sejam as responsáveis pelo “turnover” normal do tecido (Caplan 2009).

Com relação aos mecanismos de ação sugeridos para as CTA no tecido lesado, têm-se:

- Transdiferenciação: sugere-se que a CT, célula indiferenciada e com capacidade de dar origem a outras células, encontra a célula lesada e diferencia-se com o propósito de repor essa célula que está morrendo (Phinney and Prockop 2007). No entanto, a complexidade desse mecanismo não possibilitaria a melhora funcional em muitos modelos experimentais de 24h, visto que é um tempo muito curto para a CTA diferenciar-se (Semedo, Palasio et al. 2009);

- Fusão: esse mecanismo sugere que as CTAs apresentam à capacidade de se fundir a célula lesada, possibilitando assim o reparo da mesma. Diversos estudos, entretanto, encontram poucas CTAs no tecido lesado, analisando por diversas técnicas (Spees, Olson et al. 2003); e
- Parácrino: em que as CTAs presentes no tecido lesado são ativadas pelos estímulos inflamatórios e, assim, passam a secretar diversos fatores tróficos que podem não só auxiliar a célula que está morrendo, como podem também estimular a célula-tronco local (Figura 3) (Humphreys and Bonventre 2008).

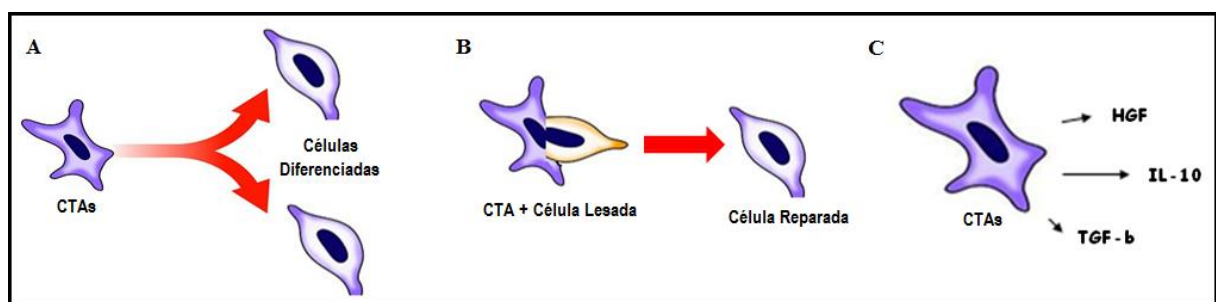


Figura 3. Mecanismo de ação sugerido para as CTA no tecido lesado.

Figura representativa dos mecanismos de ação sugeridos para as CTA no tecido lesado. Em A. tem-se o mecanismo de Transdiferenciação, onde a CT, na presença de uma célula lesada, diferencia-se originando duas células diferenciadas. Em B. tem-se o mecanismo de Fusão, em que a CT se funde a célula lesada (célula laranja) dando origem a uma célula reparada. Em C. tem-se o mecanismo de ação parácrino, onde a CT, após ativada por citocinas inflamatórias, secreta fatores tróficos que vão atuar na imunomodulação.

Atualmente, o papel parácrino da CTA é considerado como o principal mecanismo de ação. Diversos são os fatores tróficos secretados pelas CTAs, e são esses fatores os responsáveis pelos papéis anti-inflamatórios, proliferativos e antiapoptótico (Togel, Weiss et al. 2007; Humphreys and Bonventre 2008; Uccelli, Moretta et al. 2008). Estas substâncias serão descritas quanto as suas funções, características químicas, etc. mais adiante no texto.

As células-tronco adultas (CTAs) podem ser encontradas em vários tecidos, como por exemplo, placenta, cordão umbilical, medula óssea, tecido adiposo, rim, fígado, entre outros. Dentre as CTAs, as mais utilizadas são as CTMs, visto que são facilmente isoladas e apresentam rápida expansão em cultura.

Tradicionalmente, as CTMs são isoladas da medula óssea, porém vários autores vêm relatando o isolamento de células com características semelhantes às CTMs em outros tecidos, tais como tecido adiposo, sistema circulatório, músculo esquelético, sangue de cordão umbilical humano, fígado e pulmão fetal, líquido amniótico, e membrana sinovial humana (Erices, Conget et al. 2000; Campagnoli, Roberts et al. 2001; De Bari, Dell'Accio et al. 2001;

Kuznetsov, Mankani et al. 2001; Zuk, Zhu et al. 2002; In 't Anker, Scherjon et al. 2003; Tondreau, Meuleman et al. 2005). Nesse trabalho as CTMs serão isoladas do tecido adiposo.

Pensando na medicina regenerativa, Gimble, em 2003, sugeriram que as CTs ideais para utilização como tratamento de patologias, como a Insuficiência Renal, devem seguir os seguintes critérios:

- Procedimento para a obtenção das CTs o menos invasivo possível;
- Obtenção de um grande número de células;
- CTs que gerem grande número de células quando mantidas em culturas; e
- Células transplantadas de maneira autóloga, ou seja, as CTs são retiradas da própria pessoa, eliminando, assim, o risco de rejeição (Gimble 2003; Gimble, Katz et al. 2007).

Dentre as CTAs, as células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTAd) são as que mais se aproximam dos critérios acima, visto que uma aspiração da medula óssea para obtenção de CTMs é uma técnica mais invasiva do que uma lipoaspiração, dessa forma a utilização de CTAds na medicina regenerativa é mais vantajosa do que a utilização de CTMs. Em 2002, Zuk et al. isolaram CTAds do tecido adiposo humano obtido pela técnica de lipoaspiração. A partir deste estudo, o interesse por esse tipo celular vem aumentando, devido à fácil obtenção dessas células, e devido suas propriedades de reparo, anti-inflamatórias e pró-angiogênicas (Mazo, Planat-Benard et al. 2008; Kondo, Shintani et al. 2009).

Em 1976, Friedenstein e colaboradores isolaram as primeiras células-tronco mesenquimais (CTMs); estas foram consideradas como células da medula óssea com capacidade de formar unidades de colônia semelhantes a fibroblastos *in vitro* (CFU-F) (Friedenstein, Chailakhjan et al. 1970). Em 1991, Caplan definiu o termo CTM como uma célula capaz de dar origem a outras linhagens de células diferentes da sua origem (Caplan 1991). Em 2005, a Sociedade Internacional para Pesquisa de Células-tronco (ISSCR) definiu critérios que caracterizam as CTMs, são eles: adesão ao plástico, diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condroblastos, e expressão de algumas moléculas de sua superfície (CD - *cluster differentiation*).

O Comitê de Células-tronco Mesenquimais e dos Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), padronizou a nomenclatura e definiu que:

1. CTMs devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em cultura;
2. CTMs devem diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*;

3. CTMs devem expressar CD105, CD73 e CD90 e não expressar os marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR (Dominici, Le Blanc et al. 2006).

2.3 Papel Imunossupressor das CTMs

Alguns trabalhos já vêm demonstrando que as CTMs possuem um papel imunomodulador. Essas células podem suprimir a resposta imune, através da inibição da proliferação de células T, B, células *natural killers* (NK) e células apresentadoras de antígenos, via seu mecanismo de secreção parácrino (Le Blanc and Ringden 2007; Nauta and Fibbe 2007; Uccelli, Moretta et al. 2008). Para que isso ocorra as CTMs precisam ser estimuladas pela concentração de várias citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN γ , presentes no tecido lesado (Figura 4) (Humphreys and Bonventre 2008).

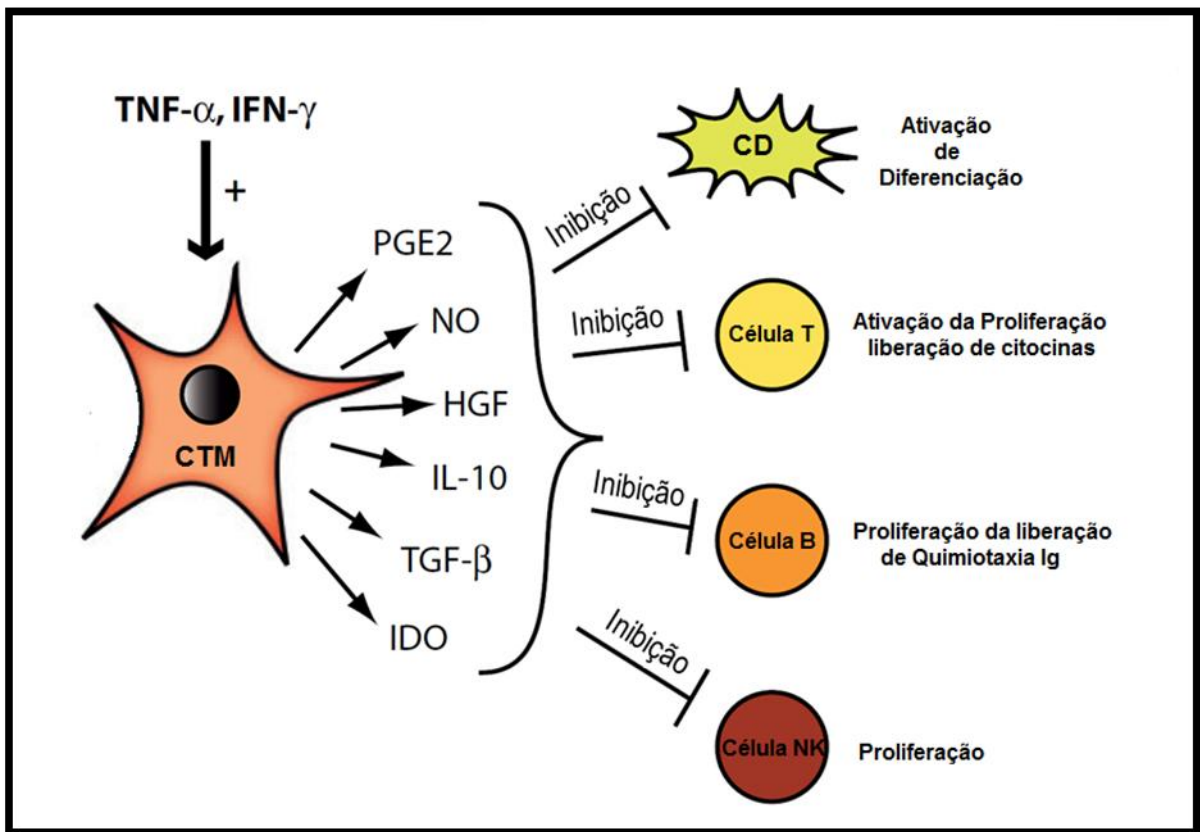


Figura 4. Mecanismo de imunomodulação das células-tronco mesenquimais.

Na presença de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IFN γ , as células-tronco mesenquimais são estimuladas e passam a liberar fatores tróficos (IDO, IL-10, TGF- β , entre outros) que irão inibir a proliferação das células do sistema imune. Figura adaptada de Humphreys, B. D. and Bonventre J. V. 2008.

O principal mecanismo de ação das CTs é o parácrino (secreção de fatores tróficos). Também é sugerido que o processo de reparação ocorra através de fusão celular ou substituição da célula lesada. Ainda não se tem muito conhecimento sobre o mecanismo de ação dessas células nos rins, no entanto é sabido que os principais fatores secretados pelas CTMs são: IDO 2, 3 (indolamina 2, 3 deoxigenase) (Ryan, Barry et al. 2007), TGF- β (*transforming growth factor* β) (Di Nicola, Carlo-Stella et al. 2002), HGF (*hepatocyte growth factor*) (Di Nicola, Carlo-Stella et al. 2002), prostaglandina E2 (Aggarwal and Pittenger 2005), heme-oxigenase (Chabannes, Hill et al. 2007) e óxido nítrico (NO) (Sato, Ozaki et al. 2007); e todos eles possuem propriedades imunomoduladoras.

Dados prévios do nosso laboratório mostram que o tratamento com CTMs leva a melhora funcional num modelo de insuficiência renal aguda, com melhora das características histológicas e diminuição da inflamação local (Semedo, Wang et al. 2007; Semedo, Correa-Costa et al. 2009; Semedo, Palasio et al. 2009).

De uma forma geral, o transplante de CTM se mostrou capaz de regenerar diversos órgãos, desde coração, cérebro até rins, em modelos animais. As CTMs humanas secretam várias citocinas antiinflamatórias (HGF, IL-10 e TGF- β), como descrito anteriormente, que em determinadas concentrações poderiam suprimir uma resposta alogênica. Essas células também expressam ciclo-oxigenase 1 e 2, e assim tem a capacidade de sintetizar prostaglandina E2 (PGE2) (Uccelli, Moretta et al. 2008).

Ryan et al demonstraram que na presença da citocina pró-inflamatória IFN γ , o mecanismo imune protetor das CTMs é potencializado, devido a síntese da enzima IDO 2,3 (Krampera, Cosmi et al. 2006; Ryan, Barry et al. 2007). O IFN γ estimula a síntese de prostaglandinas envolvidas no catabolismo do triptofano e geração de quinureninas, inibindo assim a proliferação de linfócitos (Chabannes, Hill et al. 2007).

A ativação de CTMs no nicho inflamatório acontece devido à presença de citocinas inflamatórias (TNF e IFN γ) produzidas por monócitos e linfócitos ativados. Com isso, as CTMs se dirigem ao local da inflamação e passam a liberar uma grande quantidade de quimiocinas, óxido nítrico (NO) ou IDO. As quimiocinas atraem os linfócitos, aumentando, assim, sua proximidade com as CTMs, que passarão a produzir NO (CTMs de ratos), inibindo a ativação e proliferação de linfócitos; ou IDO (CTMs de humanos, inibindo a proliferação de linfócitos e/ou induzindo as células T reguladoras (Tregs) (Figura 5) (Shi, Hu et al. 2010).

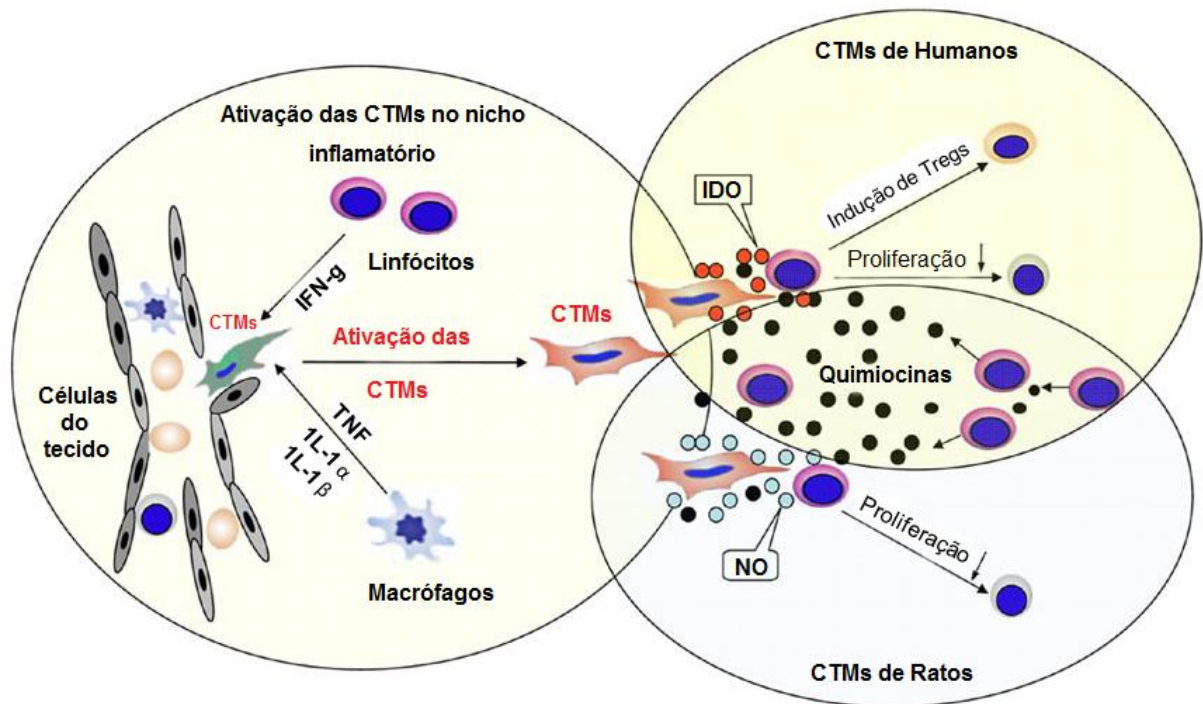


Figura 5. Ativação das CTMs no nicho inflamatório e Imunossupressão de linfócitos. Na presença de citocinas inflamatórias (TNF e IFN γ) liberadas por monócitos e linfócitos ativados, as CTMs são ativadas e passam a produzir quimiocinas que atraem os linfócitos. A proximidade entre as CTMs e os linfócitos estimula as CTMs a sintetizar óxido nítrico (NO) ou idolamina (IDO), atuando, assim, na imunossupressão dos linfócitos. Figura adaptada de Shi, Y.; Hu, G. et al. 2010.

3. Justificativa

A insuficiência renal aguda (IRA) é uma síndrome com elevada taxa de mortalidade. Apesar dos avanços terapêuticos já obtidos, esses índices continuam elevados. A terapia com células-tronco para a IRA vem surgindo como uma terapia alternativa. Sabe-se que as CTMs possuem efeito imunossupressor e protetor em doenças renais, porém pouco se sabe sobre a ativação das CTMs no ambiente patológico. Assim, buscamos estudar o papel da citocina inflamatória IFN γ na ativação das células-tronco no ambiente de lesão renal aguda.

4. Objetivo

Analisar o papel reparador e imunomodulador das CTMs deficientes de receptor para IFN- γ em modelos renais agudos.

Características a serem estudados

- a) Função renal no soro dos animais com 24 horas de perfusão.
- b) Morfometria renal para quantificação de necrose tubular aguda e regeneração tubular no tecido renal dos animais com 24 horas de perfusão.
- c) Expressão gênica de citocinas pró- e antiinflamatórias por técnica de PCR em tempo real no rim dos animais com 24 horas de reperfusão.
- d) Imunohistoquímica para PCNA (Antígeno nuclear de proliferação celular) no tecido renal dos animais com 24 horas de perfusão.

5. Materiais e Métodos

Animais

Os camundongos nocautes para receptor de IFN γ (IFN γ r KO) foram fornecidos pelo Biotério da USP, de acordo com a solicitação feita pelo Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Camara ao comitê de ética da USP. Animais selvagens (controle) foram fornecidos pelo Centro para Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram mantidos no biotério da Disciplina de Nefrologia da UNIFESP antes e depois do procedimento cirúrgico. (Comitê de Ética – UNIFESP/EPM: 0635/2010)

Isolamento das CTMs de camundongos nocautes para IFN γ e de animais selvagens

Todas estas células já foram previamente caracterizadas e as culturas estabelecidas no nosso laboratório.

As células-tronco mesenquimais adultas podem ser isoladas da medula óssea ou do tecido adiposo. Neste trabalho, as CTMs foram obtidas do tecido adiposo de camundongos nocautes para receptor de IFN γ e de animais selvagens.

Camundongos machos jovens (6-8 semanas) foram sacrificados para a obtenção do tecido adiposo inguinal. O tecido foi colocado em tubo estéril. Posteriormente, foi lavado com PBS, invertendo-se lentamente. O aspirado adiposo foi colocado em um tubo contendo 4,0 mL de collagenase I e o tecido cortado em pedaços pequenos. O tubo foi incubado a 37°C por 30 min, sendo agitado a cada 5 min. Após a incubação, adicionou-se 3,0 mL de Soro Fetal Bovino, sendo centrifugado a 12000 rpm por 5 min. Depois, foi adicionado 2,0 mL de Solução de Lise de Hemácias (NH₄Cl 0,84%), sendo novamente centrifugado a 12000 rpm por 5 min. A solução de lise foi aspirada e as células suspendidas em meio de cultura. As células obtidas foram cultivadas em meio DMEM low glucose (invitrogen) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Hyclone). Após confluência de 80-90%, as células foram tripsinizadas e mantidas em cultura até o 7º subcultivo (passagem 7).

Dois ensaios de caracterização foram realizados: diferenciação das CTMs em adipócitos e osteócitos e imunofenotipagem como seguem abaixo.

Diferenciação das células-tronco

Para a caracterização funcional das células-tronco, foram empregados dois testes de plasticidade:

- *Diferenciação adipogênica:* CTs da primeira ou segunda passagem foram cultivadas em placas de 6 poços com meio de cultura DMEM até atingirem confluência. Nesse ponto, o meio de cultura DMEM foi trocado por o meio de cultura de indução de adipogênese que consiste em meio DMEM (alta glucose, 4,5 g/l) suplementado com 1µM de dexametasona, 100 µM de indometacina, 10 µg/ml de insulina, 0,5 mM 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma, USA) e 10% de SBF, por três dias. Em seguida, o meio de indução de adipogênese foi trocado por um meio de manutenção - DMEM (alta glucose, 4,5 g/l) suplementado com 10 µg/ml de insulina e 10% de SBF. Essa estimulação foi repetida duas vezes, num total de 18 dias de tratamento. As células de controle foram cultivadas no meio DMEM suplementado apenas com 10% SBF. Os níveis de diferenciação foram examinados por microscopia e exames histológicos. A análise da expressão de genes específicos de adipogênese, como o PPAR-g, foi realizada no 18º dia de diferenciação.
- *Diferenciação osteogênica:* A diferenciação osteogênica foi induzida na primeira ou segunda passagem da cultura das CTs. As CT foram incubadas com meio de cultura contendo 0,1mM dexametasona, 10 mM de sódio α-glicerofosfato e 0,2 mM de ácido ascórbico (Sigma,USA). O meio foi trocado a cada 3 dias e as células mantidas em cultura por 24 dias. O nível da diferenciação osteogênica foi analisado por microscopia através da coloração Von Kossa.

Análise dos marcadores de superfície das células-tronco

As células-tronco adiposas foram removidas das placas de cultura pela utilização de tripsina 10%, e contadas através da câmara de Neubauer. Aproximadamente, 5.10^5 células foram incubadas por 30 min, a 4°C com o anticorpo para marcação de moléculas de superfície CD45 (BD), CD34 (Santa Cruz), CD 105 (BD) e CD73, na diluição de 1:10. Após o período, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas (1% paraformaldeído, 0,1% azida sódica e 0,5% SFB). Sendo então analisadas em FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

Ensaio de proliferação celular

O ensaio de proliferação celular foi realizado utilizando-se o “kit Vybrant MTT Cell Proliferation Assay” (Pierce), de acordo com o protocolo sugerido. Inicialmente, fez-se uma curva padrão com quantidade de células CTAd de animais selvagens C57 e CTAd de animais

nocautes para o receptor de IFN γ , variando de 1.10^3 até 1.10^5 células, versus absorbância a 520nm do reagente formazan que foi dissolvido na presença de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma®). Realizada a curva padrão, subcultivou-se vários poços de um “Multiwell 96” com a mesma quantidade de células. A cada dia, em 4 poços foram adicionados 100 μ L de MTT 0,5 mg/mL dissolvido em meio de cultura na ausência de soro fetal bovino, incubado por 4h, a 37°C em ambiente de 5% de CO $_2$. Após este período, foi adicionado 100 μ L de DMSO a solução. A reação foi incubada por 10 minutos, a 37°C e a seguir a placa submetida à leitura a 520nm no leitor de Elisa (Asys Expert Plus, Hytech; Áustria) da Bio-tek instruments. Inc (Highland Park, WI, EUA).

Modelo experimental de lesão renal aguda

Os animais foram submetidos à anestesia com ketamina-xilazina (100mg/Kg de Ketamina, 10mg/kg de xilasina) (Agribands do Brasil Ltda, São Paulo) por via intraperitoneal (IP), na dose de 0,004 mg/g de peso, em dose única. Os pedículos renais foram ocluídos com cliques microvasculares (Rocca, São Paulo, Brasil) por 45 minutos. Os animais foram mantidos em aquecimento por iluminação indireta até completa recuperação da anestesia. Após este período (45min), os clamps foram retirados e os rins manipulados foram massageados até que se observasse a sua total reperusão.

Ambas as células isoladas, CTAds selvagens e nocautes para receptor de IFN γ , foram administradas endovenosamente nos animais selvagens, a concentração a ser infundida foi de 5×10^5 células/animal. Esta concentração já foi estipulada por experimentos anteriores do laboratório e consolidada na literatura.

Avaliação da função renal

Dosagem de creatinina sérica

Por overdose de anestésico, os animais foram sacrificados e o sangue coletado. Após coagular, o sangue foi centrifugado a 10.000g por 10min, sendo o soro separado. Este é submetido ao teste colorimétrico, baseado em Jaffé, para a dosagem de creatinina. O método baseia-se na reação de creatinina com ácido pícrico, que gera um produto cromógeno chamado picrato de creatinina passível de ser analisado por espectrofotometria ou ELISA, a 520nm.

Dosagem de uréia sérica

O soro coletado foi submetido a determinação de uréia para análise funcional pelo kit de Uréia da Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil). A uréia é hidrolisada pela urease a íons amônia e CO₂. Os íons amônia reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol. A formação de cor é proporcional à quantidade de uréia na amostra. Esta pode ser analisada por espectrofotometria/ELISA a 620nm.

Histologia

Necrose tubular aguda (NTA)

Os rins foram retirados, em condições assépticas, porém não estéreis, e com os animais sobre efeito de anestésico (Ketamina-Xilazina). Após seccionada e retirada à cápsula renal, o rim foi cortado e fixado em formol tamponado a 10% até a montagem em blocos de parafina. Fragmentos de 3µm foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). A NTA foi semiquantificada através de cruzes, avaliando a percentagem de área da medula externa com características morfológicas compatíveis com a NTA (vacuolização intracelular, colapso e distensão tubular). As lâminas foram analisadas por patologistas em um experimento cego.

Imunohistoquímica

Os tecidos foram cortados com 3,0 mm de espessura e montados em lâminas silanizadas. Em seguida, os cortes foram desparafinizados em xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos (2 banhos), seguido de hidratação através da incubação das lâminas em álcool (4 concentrações diferentes decrescentes- 100%, 90%, 75% e 50%); e lavados com solução salina tamponada em pH 7,4 por 5 minutos. Posteriormente, os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio a 3% (Merck) diluído em PBS por 5 minutos para bloqueio da peroxidase endógena, com o total de 2 bloqueios. Para recuperação dos epítomos dos antígenos a serem utilizados, foi empregado o método de recuperação pelo calor com tampão adequado a cada anticorpo. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários PCNA (Antígeno nuclear de proliferação celular - Dako), por 1 hora. Após essa 1h, foi colocado EnVision+/ HRP Dual Link Dako sobre os tecidos e foi realizada uma incubação de 30 min. Para a leitura da reação, os cortes foram tratados com solução de DAB (3-3)-tetrahidrocloreto e diaminobenzidina na concentração de 1mg/ml diluída na solução tampão de PBS e na solução de peróxido de hidrogênio (Merck) por 5 min. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris por 20 min e submetidos posteriormente à desidratação em 4 banhos

de álcool etílico em concentrações crescentes – 50%, 75%, 90% e 100% - (Merck) e 2 banhos de xilol (Merck).

PCR – Polimerase Chain Reaction

Os fragmentos do rim foram retirados em técnica asséptica com animais sob anestesia com Ketamina-Xilazina. Foi realizada a incisão xifopubiana mediana, seguida da exposição dos rins após rebaterem-se as vísceras abdominais para o tórax. Um fragmento do rim foi retirado (aproximadamente 100mg), colocado em tubo de poliestireno de 1,5 ml (EPPENDORF®) e, imediatamente, congelado em nitrogênio líquido. A seguir, as amostras foram homogeneizadas e manipuladas segundo o método de extração de RNA total TRizol® (Invitrogen) que será descrito a seguir.

Extração e purificação de RNA total - método TRizol®

O rim congelado em N_{2(l)} (aproximadamente 50 mg) foi triturado com o homogenizador POLYTRON® (Kinematica, Luzern, Alemanha) e ressuspensando em 1,0 ml de TRizol (Invitrogen, EUA). O método utiliza solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato que lisa e dissolve componentes celulares mantendo a integridade do RNA. Às amostras de tecido renal dissolvidas em Trizol® foi adicionado clorofórmio (MERCK) (0,2 ml de clorofórmio/1ml de TRizol®), centrifugadas a 4°C, 12000g, para a obtenção de duas fases, uma orgânica e outra aquosa, onde encontraremos todo o RNA. O RNA foi reconstituído através da adição de isopropanol (MERCK) (0,5 ml de isopropanol/1ml de TRizol®) seguida de centrifugação 12000g, obtendo-se o RNA precipitado. Após o isolamento, o RNA foi lavado com etanol a 75% (MERCK) (1ml de etanol/1ml de TRizol®) e novamente centrifugado a 10500g. O pellet de RNA formado foi ressuspensado em água bidestilada livre de RNase e DNase (GIBCO). Após esta etapa, quantificaremos o RNA diluído, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop (ND-1000 UV-Vis). Amostras de RNA só foram usadas quando as relações comprimentos de onda de 260/280nm e 260/230 forem acima de 1,8. O RNA total foi estocado a –80°C até o uso.

Síntese do DNA complementar (cDNA)

A partir do RNAm purificado foi preparado o cDNA utilizando-se 2µg deste RNA (com volume máximo de 19 µl). Em um tubo EPPENDORF® acrescentou-se 2,4 µl de 10x Dnase I Reaction e 1µl de Dnase I (Invitrogen, EUA) e elevando o volume a 23µl com água

DEPC. A reação foi incubada por 15 minutos a 25°C. Para inibir a ação da Dnase I, adiciona-se 1,0 µl de solução de EGTA (Promega, Madison, EUA) juntamente com o Oligo dT (Invitrogen, EUA) e foi incubado por 10 minutos a 65°C.

Na fase de linearização da cadeia, o RNA tratado foi transferido para o gelo, e este incubado por 5 minutos. Para a reação de transcrição reversa foi preparado uma solução contendo 10µl de 5X “*First Strand Buffer*” (Promega), 1µl de “BSA – bovine serum albumin” (Promega), 10µl de desoxibonucleotídio (dNTP) – (Promega), com 10mM de cada base (A, T, C, G). Esta mistura foi adicionada ao tubo EPPENDORF® contendo a amostra de RNA que foi incubada. Adicionou-se a este tubo 2 µl de M-MLV Reverse Transcriptase (200U/µ) (Promega), e o material foi incubado a 37°C por 60 minutos, 65°C por 10min e mantido a 4°C até uso.

Reação de PCR em tempo real:

Para amplificar o transcrito gênico, utilizou-se primers TaqMan (Applied Biosystems, Reino Unido). Cada reação foi realizada em triplicata em reações com volume final de 10,0 µL e em cada ensaio, sendo utilizados controles positivos e negativos. Para tal adicionou-se 5,0 µL de Mix TaqMan, 0,5µL de primer e 1µL de cDNA completando com água até 10,0 µL. A reação foi realizada em aparelho ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystem, Reino Unido). Uma relação comparativa entre os ciclos da reação (CT) foi usada para determinar a expressão gênica, em relação ao controle HPRT (gene housekeeping, calibrador). Dessa maneira, níveis arbitrários de mRNA foram expressos como uma diferença de “n” vezes em relação ao calibrador. Para cada amostra, os valores CT dos genes-alvo foram normalizados e o valor usado para demonstrar a expressão relativa dos genes alvo foi calculado utilizando a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Previamente descrita por K. Livak – PE – Applied Biosystems; Sequence Detector User Bulletin 2). Para reduzir a variabilidade dependente de erros de pipetagem nos resultados, foram feitas pré-misturas contendo primers, PCR Master Mix® e água Milli Q em quantidades proporcionais ao número de amostras programadas em cada experimento. Após homogeneização em Vórtex^â, alíquotas desta mistura foram transferidas aos tubos onde, posteriormente, as amostras de cDNA foram depositadas. As amostras foram, então, submetidas, em triplicatas, a 40 ciclos térmicos no ABI Prism^â 7700 sequence detector.

Amostras de tecido renal foram analisadas quanto à presença de transcritos gênicos de HPRT (controle de presença e qualidade de mRNA), de Bcl2, Bax, além de quimiocinas como MCP-1 (fator quimiotático de macrófago) e algumas citocinas como IL-6 e IL-10.

Análise estatística

As diferenças entre os grupos, em relação às variáveis do estudo, foram avaliadas através da análise de variância ANOVA unicaudal. Quando as amostras não apresentarem distribuição normal, foram submetidas à análise de variância ANOVA unicaudal de postos, pelo teste de Kruskal-Wallis. Quando houver diferença, os grupos foram comparados entre si com correção de Student-Newman-Keuls para variáveis paramétricas e correção de Dunn para variáveis não paramétricas. Os resultados foram apresentados com média $\pm$ desvio padrão, para variáveis paramétricas, e sob a forma de mediana e faixa de variação para variáveis não paramétricas. As diferenças foram consideradas significantes quando o valor de p for menor que 0,05.

6. Resultados

Cultura de células-tronco adiposas de animais selvagens e nocautes para o receptor do IFN γ

As células-tronco derivadas de tecido adiposo de camundongos selvagens e nocautes para o receptor de IFN γ foram isoladas da gordura inguinal de camundongos machos e cultivadas *in vitro* por, aproximadamente, 15 dias, onde foi observado um rápido crescimento.

As células CTAd de animais selvagens apresentaram-se similares em cultura com as CTAd de animais nocautes para o receptor de IFN γ . Fenotipicamente, ambas são similares a um fibroblasto (Figura 6), aderentes em cultura e formadoras de colônias na primeira passagem.

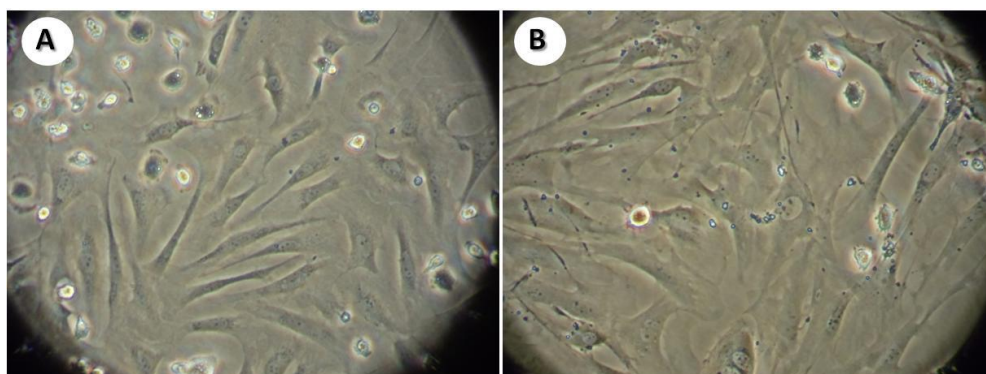


Figura 6. Em A célula-tronco adiposa normal. Em B célula-tronco adiposa nocaute para receptor de IFN- γ . Ambas as células foram isoladas do tecido adiposo inguinal de camundongos machos jovens (6 – 8 semanas). Estas CTAds foram obtidas na primeira passagem e possuem perfil fibroblastóide. Ambas as células, CTAds selvagens e CTAds nocautes, apresentaram o mesmo perfil em cultura.

Caracterização das células-tronco adiposas de animais selvagens e nocautes para o receptor do IFN γ isoladas

Antes das CTAds serem administradas intraperitonealmente nos animais que sofreram isquemia, estas foram caracterizadas por imunofenotipagem com os marcadores de superfície: CD34, CD45, CD73 e CD105. Esses CDs foram descritos na literatura e aceitos como marcadores pela sociedade internacional de pesquisa sobre células-tronco. Após a caracterização das CTAds por imunofenotipagem, foi analisado o potencial de diferenciação dessas células *in vitro* para adipócito e osteócito.

Além da similaridade fenotípica, foi possível observar que as CTAds normais e nocautes para IFN γ também apresentaram-se similares quanto as análises imunofenotípicas, pois ambas expressam positivamente CD105 e CD73, e negativamente CD34 e CD45 (Figura 7), caracterizando-as como células-tronco (Zuk, Zhu et al. 2002; Dominici, Le Blanc et al.

2006; Kuhbier, Weyand et al. 2010). Aparentemente, CTAds de animais nocautes possuem maior expressão de CD105 e menor expressão de CD34, porém sem significância estatística.

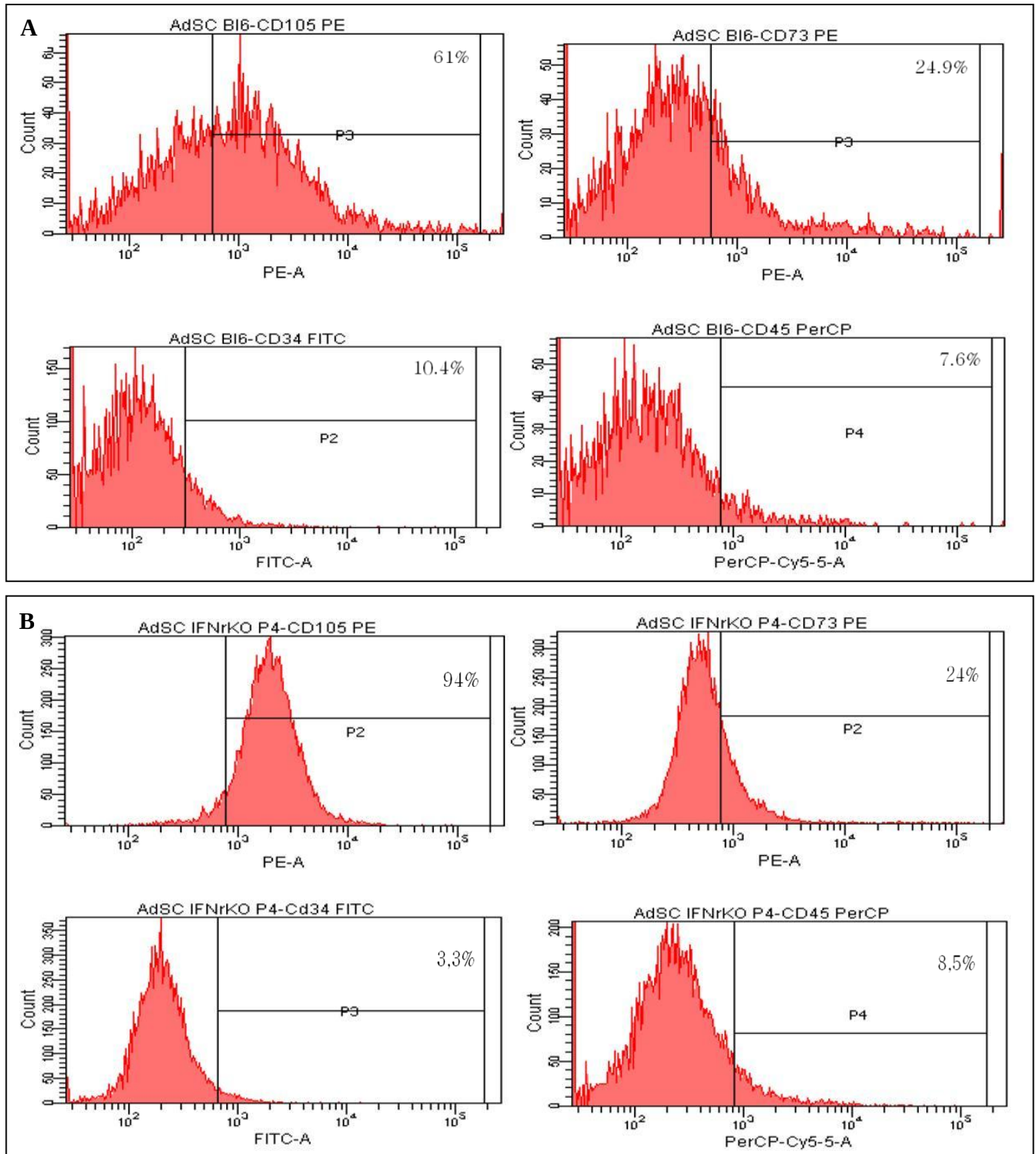


Figura 7. Imunofenotipagem (FACS análises) de células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTAds).

Camundongos C57/Bl6 e camundongos nocautes para receptor IFN γ foram sacrificados e o tecido adiposo coletado, digerido com collagenase e cultivado por quatro passagens, até ser usado em modelo animal. Em A

têm-se o ensaio de imunofenotipagem das CTAds de animais selvagens para CD73, CD105, CD45 e CD34. Em B têm-se o ensaio de imunofenotipagem das CTAds de animais nocautes para receptor IFN γ para CD73, CD105, CD45 e CD34. As células foram analisadas em FACSCanto (BD).

Em relação ao potencial de diferenciação, inerente a essas células, ambas, apresentam potencial para diferenciar-se em adipócito e osteócito (Figura 8).

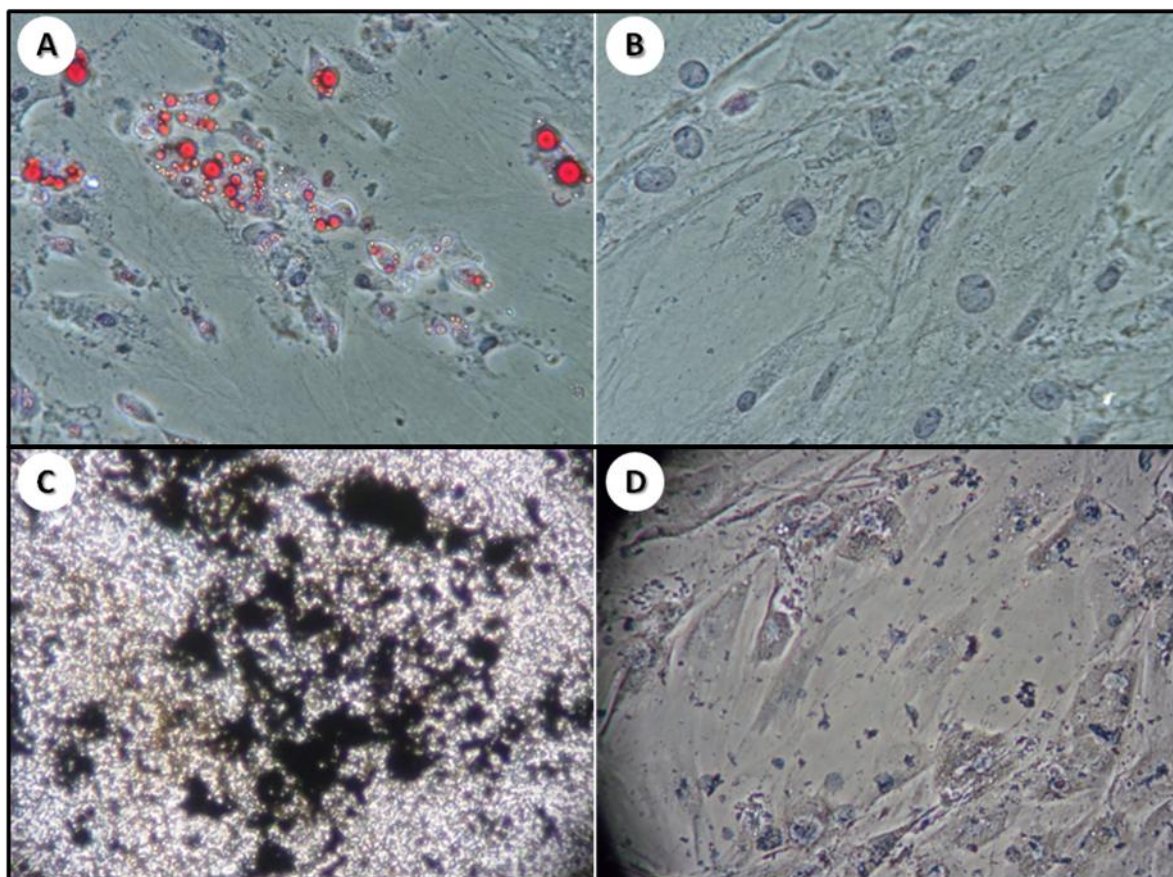


Figura 8. Diferenciação celular de células-tronco adiposas.

Em A, CTAds diferenciadas para adipócitos e, em vermelho, vesículas adiposas coradas com Oil Red e contracoradas com Hematoxilina de Harris. Essas células foram submetidas a meio de cultura suplementado com insulina, dexametasona, IBMX e indometacina, e mantidas em cultura por 18 a 21 dias. Em B, CTAds controle mantidas em cultura por 18/21 dias, não incubadas com o meio de diferenciação para adipócitos, coradas com Hematoxilina de Harris. Em C, CTAds diferenciadas para osteócitos, essas células foram mantidas em cultura por 28/30 dias, incubadas em meio contendo dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato. Em D, CTAds controle, não incubadas com o meio de diferenciação para osteócitos e mantidas em cultura por 30 dias. Coloração de Von Kossa, que permite analisar depósitos de cálcio. Ambos os tipos celulares (do animal selvagem e do nocaute) apresentaram potencial para diferenciar.

Adicionalmente, avaliando a proliferação de ambos os tipos celulares, podemos observar que a capacidade proliferativa das CTAds oriundas de animais nocautes para o receptor IFN γ é menor do que dos animais selvagens (Figura 9). A partir de 48hs da análise do crescimento, foi notável que o crescimento das CTAd normais é maior que o das CTAd

nocautes para IFN γ . Mesmo com a queda no crescimento em 72hs de análise, as CTAd normais continuaram apresentando em crescimento maior que as CTAd nocautes para IFN γ . Esse dado chama atenção, apesar das semelhanças fenotípicas até então obtidas.

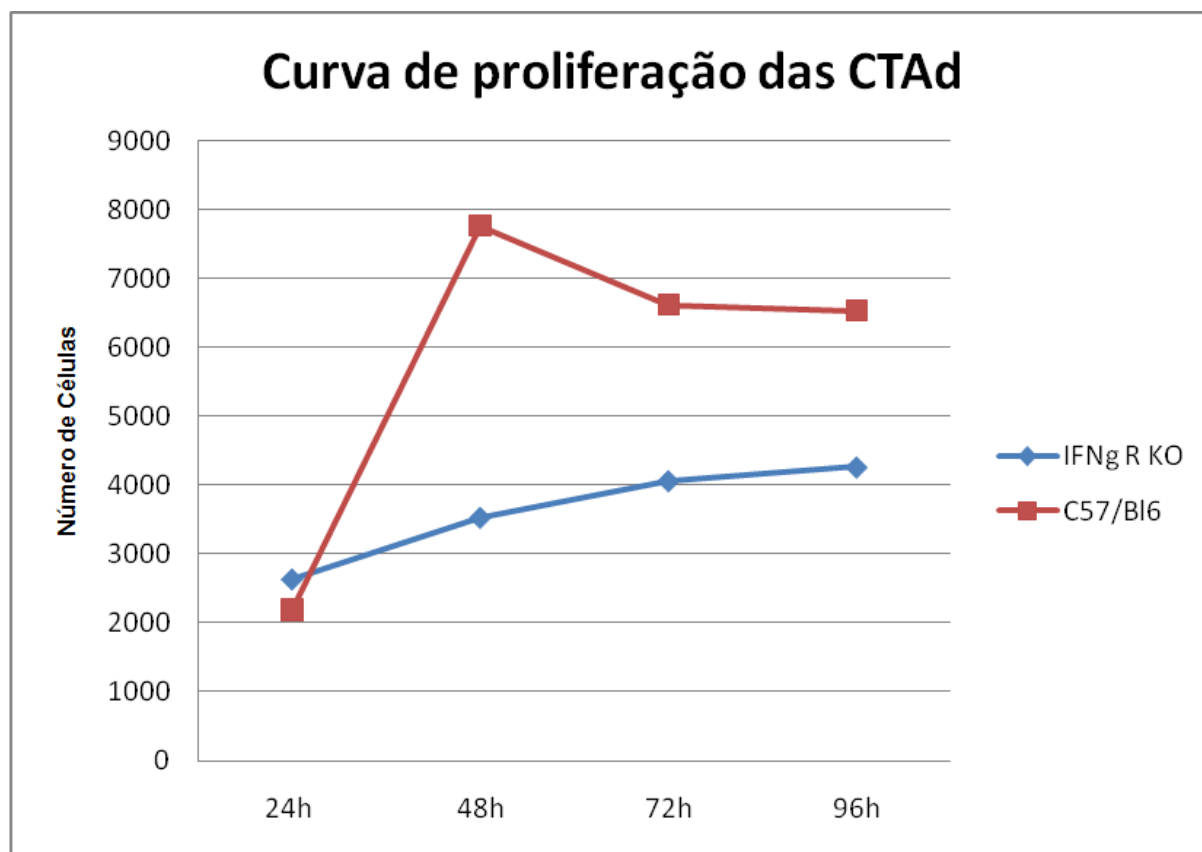


Figura 9. Curva de proliferação das CTAd normais e nocautes para IFN γ .

Ensaio de proliferação celular realizado utilizando-se o “kit Vybrant MTT Cell Proliferation Assay”. Inicialmente fez-se uma curva padrão com quantidade de células CTAd controle de C57 e CTAd de animais nocautes para o receptor de IFN γ , variando de 1.103 até 1.105 células, versus absorbância a 520nm do reagente formazan que foi dissolvido na presença de DMSO. Realizada a curva padrão, subcultivou-se vários poços de um “Multiwell 96” com a mesma quantidade de células. A cada dia, em 4 poços foi adicionado MTT 0,5 mg/mL dissolvido em meio de cultura na ausência de soro fetal bovino, incubado por 4h, a 37°C em ambiente de 5% de CO $_2$. Após este período, foi adicionado DMSO a solução. A reação foi incubada por 10 minutos, a 37°C e a seguir a placa submetida à leitura a 520nm no leitor de Elisa.

Tratamento com CTAd (selvagem e nocaute) no modelo experimental de lesão renal aguda

Análise funcional do modelo de Isquemia e Reperfusão

Após a realização dos ensaios de caracterização das células-tronco, foi realizado o tratamento dos animais com lesão renal aguda com CTAd de animais selvagens e nocautes para IFN γ .

A avaliação das características funcionais mostrou que o tratamento com CTAds de animais selvagens apresentou uma redução relevante dos níveis de uréia (Figura 10) e creatinina sérica (Figura 11), o que não foi observado em animais tratados com CTAds de animais nocautes para interferon-gamma (IFN- γ R KO). Para verificar o porquê dessa redução da capacidade regenerativa no animal, avaliou-se o perfil de algumas citocinas no tecido renal.

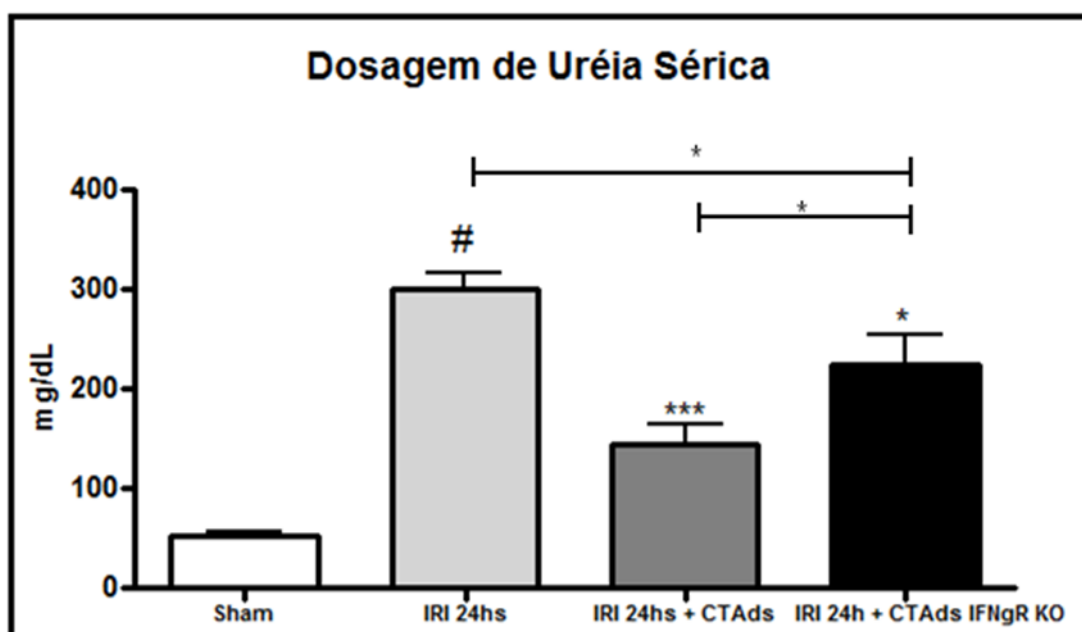


Figura 10. Características renais funcionais - Dosagem de Uréia Sérica.

Camundongos C57/Bl6 foram submetidos ao modelo de Insuficiência Renal Isquêmica (IRI) e sacrificados após 24 horas. 2×10^5 células foram administradas por via intraperitoneal após 4h de reperfusão. No sacrifício, o sangue foi coletado e submetido a medição dos níveis de uréia sérica. Para todos os grupos, $n = 8$. Os resultados são apresentados como valores médios $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,0001$ vs. IRI 24hs; # $p < 0,0001$ vs. Sham; * $p < 0,05$ vs. IRI 24hs; e * $p < 0,05$ vs IRI 24hs + CTAds (Teste T). Abreviaturas: Sham: grupo de animais que não sofreu a injúria de isquemia e reperfusão; IRI 24hs: isquemia e reperfusão; CTAd: células-tronco adiposas a partir de animais selvagens; CTAd IFN γ R KO: células-tronco adiposas a partir de animal nocaute do receptor IFN γ .

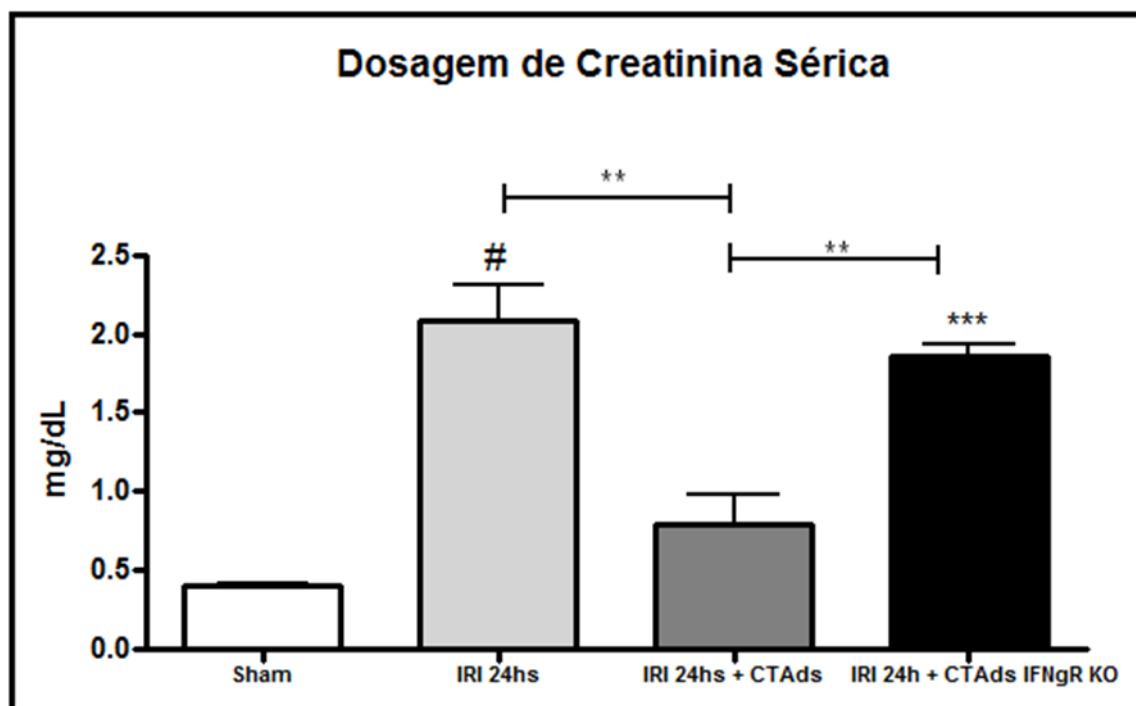


Figura 11. Características renais funcionais - Dosagem de Creatinina Sérica.

Camundongos C57/Bl6 foram submetidos ao modelo de Insuficiência Renal Isquêmica (IRI) e sacrificados após 24 horas. 2×10^5 células foram administradas por via intraperitoneal após 4h de reperfusão. No sacrifício, o sangue foi coletado e submetido a medição dos níveis de creatinina sérica. Para todos os grupos, $n = 8$. Os resultados são apresentados como valores médios $\pm$ desvio padrão. # $p < 0,001$ vs. Sham; ** $p < 0,001$ vs. IRI 24hs; e *** $p < 0,0001$ vs. Sham (Teste T). Abreviaturas: Sham: grupo de animais que não sofreu a injúria de isquemia e reperfusão; IRI 24hs: isquemia e reperfusão; CTAd: células-tronco adiposas a partir de animais selvagens; CTAd IFNgR KO: células-tronco adiposas a partir de animal nocaute do receptor IFN γ .

Semiquantificação da necrose tubular aguda (NTA) pelo método de cruzes

Após a avaliação das características funcionais, foi analisada a necrose tubular aguda através da semiquantificação pelo método de cruzes.

Os rins dos animais submetidos a IR apresentaram maior índice de grau IV de NTA do que nos animais tratados com as CTAds selvagens e nocautes para IFN γ . O grau I foi observado no grupo Sham, no tratamento com CTAds selvagem e nocaute para IFN γ (Figura 12).

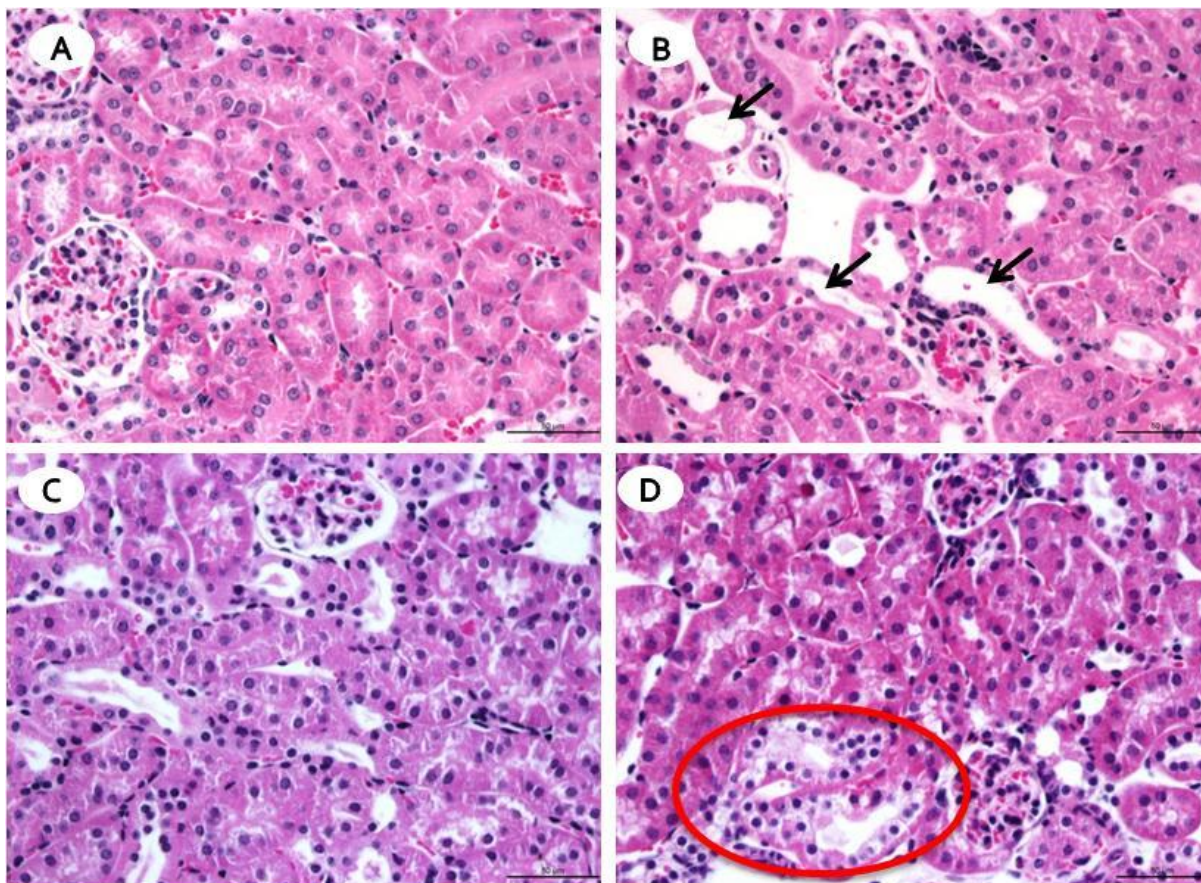


Figura 12. Avaliação de Necrose Tubular Aguda (NTA) em corte renais corados com H&E.

Após 24h da reperfusão, os animais submetidos a lesão de Isquemia e Reperfusão (I/R) foram sacrificados e seus rins coletados para análises morfológicas. Os cortes foram corados com H&E e analisados por patologista em ensaio cegos. Em A, tem-se uma foto histológica de um animal que não sofreu a injúria de I/R. Em B, tem-se a imagem de uma NTA em grau IV, retirada de uma lâmina de um animal que sofreu a injúria de I/R e que não teve tratamento (NT). As setas apontam túbulos desnudados, com algumas células necróticas no interior da luz tubular. Em C, uma foto histológica de um animal que sofreu a injúria de I/R e foi tratado com CTAd normal. Em D, imagem retirada de uma lâmina de um animal que sofreu a injúria de I/R e foi tratado com CTAd IFN γ KO, dentro do círculo em vermelho é possível observar características regenerativas como mitose e núcleos grandes e volumosos característicos de regeneração. Aumento de 40x.

A quantificação desses dados por uma patologista em ensaio cego permitiu comparar o tratamento com CTAd selvagem e CTAd nocaute para IFN γ quanto a NTA. Como observado na figura 13, os animais tratados com CTAd selvagens apresentaram necrose tubular aguda em grau I, II e III, já os animais tratados com CTAd nocautes para IFN γ apresentaram grau I, III e IV. Desse modo, fica notável que o tratamento com CTAd nocaute para IFN γ é menos eficaz do que o tratamento com CTAd selvagens.

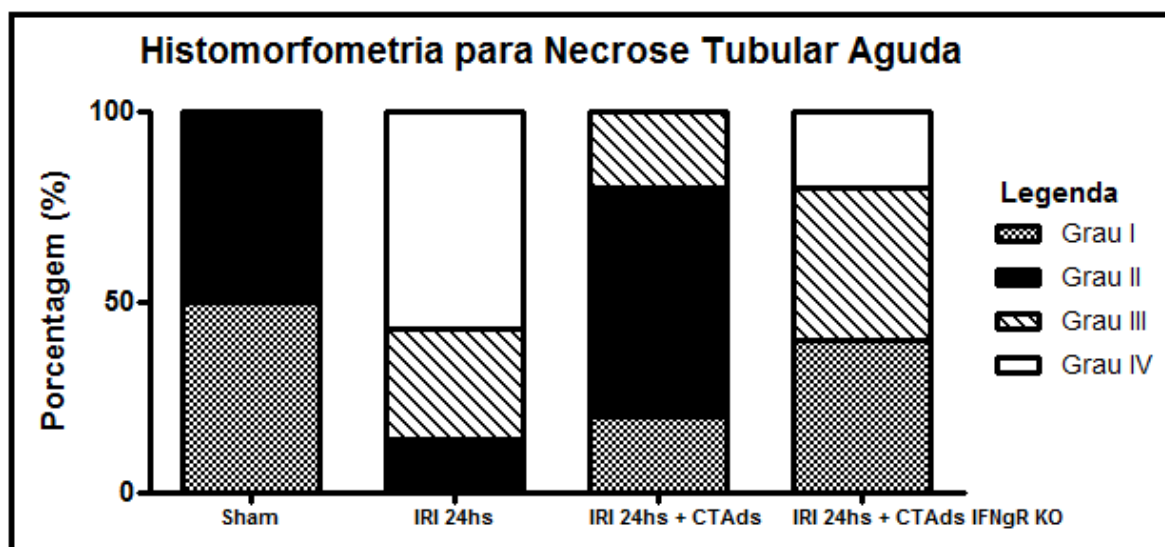


Figura 13. Histomorfometria para necrose tubular aguda. Critério histológico utilizado: grau I para descamação parcial ou total do epitélio em $< 10\%$ das estruturas tubulares corticais e medulares; grau II para descamação parcial ou total do epitélio em $\geq 10\%$ até $\leq 25\%$ das estruturas tubulares corticais e medulares; grau III para descamação parcial ou total do epitélio em $\geq 26\%$ e $\leq 50\%$ das estruturas tubulares corticais e medulares; e grau IV para descamação parcial ou total do epitélio em $> 50\%$ das estruturas tubulares corticais e medulares. Abreviaturas: Sham: grupo de animais que não sofreu a injúria de isquemia e reperfusão; IRI 24hs: isquemia e reperfusão; CTAd: células-tronco adiposas a partir de animais selvagens; CTAd IFN γ R KO: células-tronco adiposas a partir de animal nocaute do receptor IFN γ .

Imunohistoquímica para PCNA (Antígeno nuclear de proliferação celular)

Com a finalidade de analisar e comparar o perfil regenerativo dos tratamentos foi avaliado a expressão de PCNA nos cortes histológicos dos quatro grupos. O PCNA é uma molécula que só é expressa em núcleos em divisão celular.

Na Figura 14, é possível visualizar tecidos que passaram pelo processo de imunohistoquímica para PCNA. Os núcleos corados em marrom são os que se encontram em divisão celular. É notável a diferença entre os quatro grupos. Os cortes histológicos dos animais tratados com CTAds selvagens apresentaram mais núcleos corados, indicando, assim, que há maior atividade proliferativa no tecido do animal, possibilitando uma regeneração mais rápida. Sugere-se que a presença das CTMs possibilite tal evento através da secreção de fatores tróficos que auxiliem as células do túbulo renal que sofreram a lesão a se recuperar mais rápido ou ainda que impeçam que essas células morram.

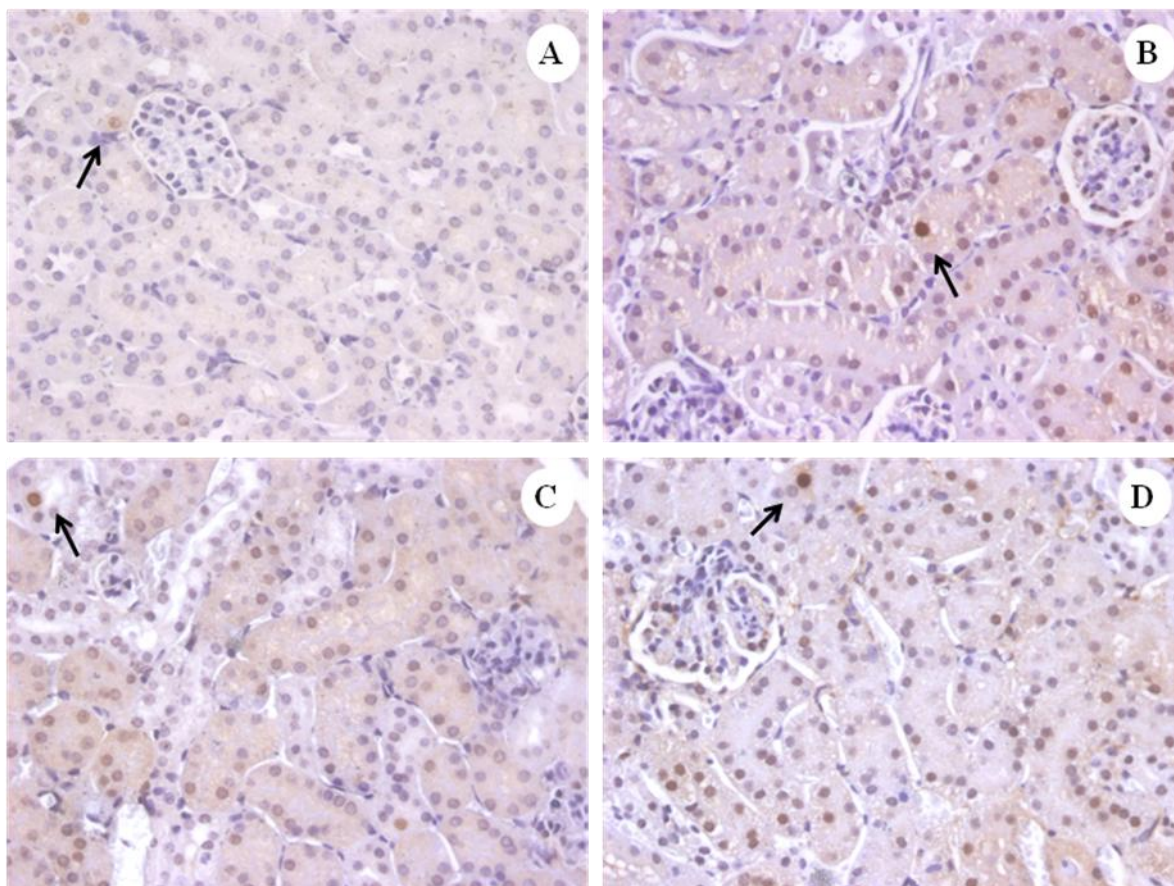


Figura 14. Imunohistoquímica para PCNA (Antígeno nuclear de proliferação celular).

Após 24h da reperfusão, os animais submetidos a lesão de Isquemia e Reperfusão (I/R) foram sacrificados e seus rins coletados para análises morfológicas. Os cortes foram corados por imunohistoquímica para PCNA. Em A, corte histológico do rim de um animal que não foi submetido a I/R e foi sacrificado em 24hs. Observar a presença de poucos núcleos corados em marrom (setas). Em B, animais submetidos a I/R, e sacrificados com 24h de reperfusão, também evidenciando a presença de poucos núcleos corados. Em C e D, corte histológico do rim de um animal submetido a I/R, tratado com CTAd normal e nocaute para o receptor de $\text{IFN}\gamma$, respectivamente, e sacrificado com 24h de reperfusão, em que é possível observar uma maior quantidade de núcleos corados, indicando maior índice proliferativo neste tecido. Aumento de 40x

A quantificação dos núcleos corados para PCNA demonstrou que existe mais núcleos corados nos animais tratados com CTAds selvagens, quanto comparado aos outros grupos. Também foi possível visualizar que há mais núcleos corados nos animais tratados com CTAds $\text{IFN}\gamma\text{R KO}$, quanto comparado ao grupo dos animais não tratados (Figura 15). Os cortes histológicos corados com a imunohistoquímica para PCNA, sugeriram que realmente o tratamento com CTAds normal e nocaute leva a uma maior atividade proliferativa, conseqüentemente denotando maior regeneração; no entanto, a regeneração tecidual foi maior nos animais tratados com CTAds selvagens.

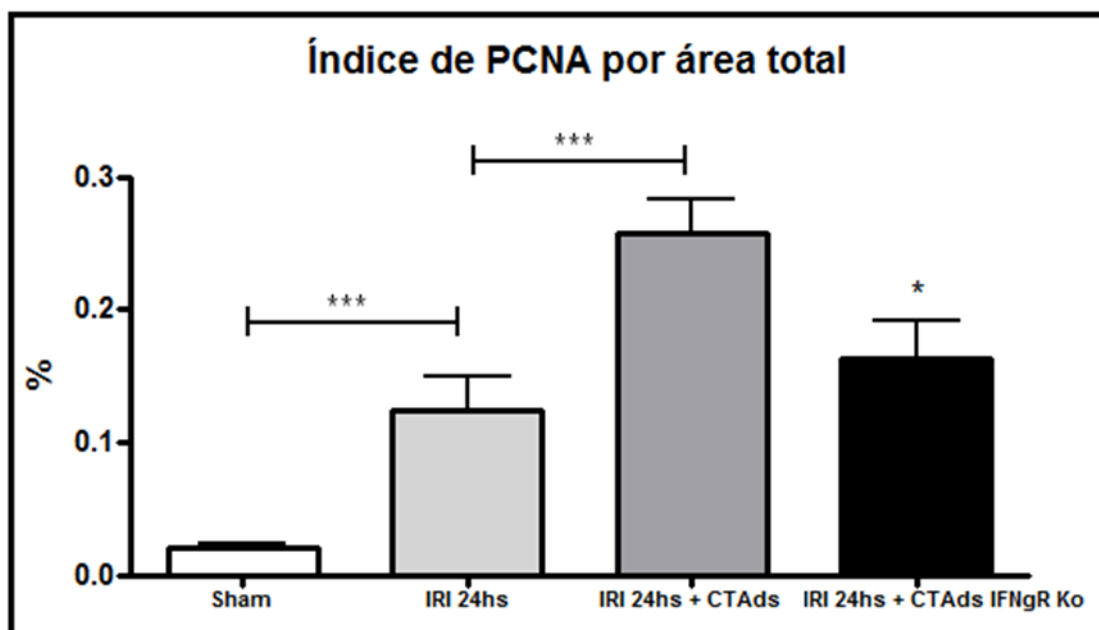


Figura 15. Quantificação dos núcleos corados por imunohistoquímica para PCNA.

As lâminas de PCNA foram quantificadas por um patologista, em ensaio cego, que analisou a quantidade de núcleos corados por área total. Quatro lâminas de cada grupo foram submetidas a imunohistoquímica para PCNA. Os dados representam média e desvio padrão com *** $p < 0,0001$ vs IRI + CTAds; *** $p < 0,0001$ vs. Sham; * $p < 0,05$ vs. IRI + CTAds (Teste T). Abreviaturas: Sham: grupo de animais que não sofreu a injúria de isquemia e reperfusão; IRI 24hs: isquemia e reperfusão; CTAd: células-tronco adiposas a partir de animais selvagens; CTAd IFN γ R KO: células-tronco adiposas a partir de animal nocaute do receptor IFN γ .

Expressão de Interleucinas nos tecidos renais

A análise da resposta inflamatória do rim demonstrou que a expressão de RNA mensageiro (RNAm) da citocinina sérica inflamatória IL-6 é maior nos animais tratados com CTAds de animais IFN γ R KO quando comparada ao tratamento com CTAds controles; porém, a expressão dos dois tratamentos é menor em relação aos animais não tratados (Figura 16).

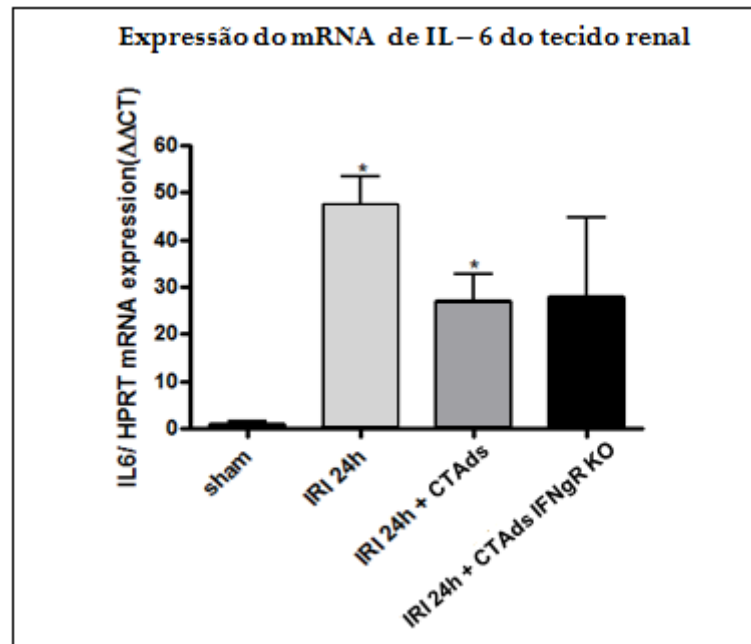


Figura 16. A expressão de mRNA de IL-6 no tecido renal após 24h. Análise da expressão gênica de rins de animais tratados com CTAds e não tratados foram realizados referenciando cada gene HPRT como um controle interno. Dados expressos como média $\pm$ SD de 2 $\Delta\Delta C_t$, * $p < 0,05$. Abreviaturas: Sham: grupo de animais que não sofreu a injúria de isquemia e reperfusão; IRI 24h: isquemia e reperfusão; CTAd: células-tronco adiposas a partir de animais selvagens; CTAd IFN γ R KO: células-tronco adiposas a partir de animal nocaute do receptor IFN- γ .

A expressão de RNAm da citocinina sérica anti-inflamatória IL-10 apresentou uma tendência de ser maior nos tratamentos com CTAds controle em comparação aos animais não tratados e aos animais tratados com CTAds de IFN γ R KO (Figura 17); porém, sem significância estatística.

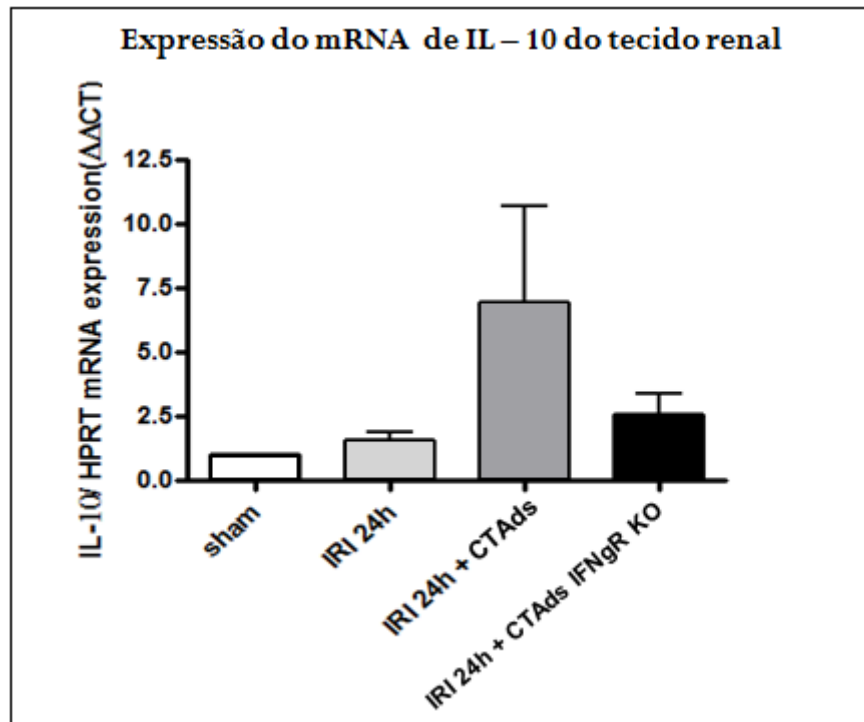


Figura 17. A expressão de mRNA de IL-10 no tecido renal após 24h. Análise da expressão gênica de rins de animais tratados com CTAds e não tratados foram realizados referenciando cada gene HPRT como um controle interno. Dados expressos como média $\pm$ SD de 2 $\Delta\Delta C_t$, * $p < 0,05$. Abreviaturas: Sham: grupo de animais que não sofreu a injúria de isquemia e reperfusão; IRI 24h: isquemia e reperfusão; CTAd: células-tronco adiposas a partir de animais selvagens; CTAd IFN γ R KO: células-tronco adiposas a partir de animal nocaute do receptor IFN- γ .

7. Discussão

Apesar de todos os avanços já obtidos nessa área, a IRA é uma síndrome com altas taxas de morbidade e mortalidade (Kellum, Le blanc et al. 2008; Wen, Murugan et al. 2010). Portanto, faz-se necessário a busca de novos tratamentos. Nesse aspecto, a administração de CTMs vem crescendo como uma perspectiva atraente (Giordano, Galderisi et al. 2007; Le Blanc and Ringden 2007).

A utilização de CTAds na medicina regenerativa é vantajosa devido a facilidade de obtenção. A técnica de lipoaspiração é menos invasiva do que a aspiração da medula óssea. Ainda, as CTAds possuem rápida expansão em cultura (Gimble 2003; Gimble, Katz et al. 2007), e, principalmente, as CTs não são reconhecidas pelo sistema imune adquirido, permitindo o transplante alogênico sem risco de rejeição, devido a baixa expressão de MHC de classe I e II (Le Blanc and Ringden 2007; Uccelli, Moretta et al. 2008; Caplan 2009). O potencial terapêutico das CTAds que mais chama atenção reside nesta capacidade imunossupressora, anti-inflamatória e regenerativa que as CTs apresentam (Le Blanc and Ringden 2007; Uccelli, Moretta et al. 2008).

Atualmente, é sugerido que após a administração *in vivo*, as CTMs se dirigem para vários tipos de órgãos, porém o nível de eficiência da CTMs em cada órgão é variável (Devine, Cobbs et al. 2003). No ambiente *in vivo*, as CTMs migram, preferencialmente, para os locais de lesão. Dessa forma sugere-se que tais células apresentam a capacidade de “sentir” o micro-ambiente local, onde elas poderão agir e promover a regeneração funcional (Chen, Li et al. 2001). Em um modelo de lesão renal aguda, não é possível encontrar a presença das CTMs no tecido lesado, no entanto sinais indiretos, tais como a melhora funcional e molecular do tecido, confirmam a presença de tais células. As CTMs serão facilmente encontradas em um tecido cujo dano é persistente (Semedo, Correa-Costa et al. 2009).

No tecido lesado, citocinas inflamatórias, como TNF e IFN γ passam a ser produzidas, respectivamente, por monócitos e linfócitos ativados. Quando as CTMs migram para o local da lesão, essas se ativam devido à presença de tais citocinas e passam a liberar óxido nítrico (NO) ou idolamina (IDO), quimiocinas que atuam na imunomodulação de linfócitos e células T reguladoras (células Tregs) (Shi, Hu et al. 2010). Sabe-se que a presença de IFN γ potencializa o mecanismo imune protetor das CTMs, devido a síntese da enzima IDO 2,3 (Krampera, Cosmi et al. 2006; Ryan, Barry et al. 2007). Portanto, é possível sugerir que o receptor de IFN γ das CTMs desempenha um papel importante na ativação e,

conseqüentemente, na imunomodulação dessas células. Porém, até o momento são poucos os estudos nessa área.

As células-tronco, nocautes e normais, utilizadas neste trabalho foram isoladas do tecido inguinal de camundongos jovens e caracterizadas quanto aos marcadores de superfície e a capacidade de diferenciação em adipócito e osteócito (Zuk, Zhu et al. 2002; Dominici, Le Blanc et al. 2006; Kuhbier, Weyand et al. 2010). Ambas as células, nocautes e normais, apresentaram-se similares em cultura. Fenotipicamente, são similares a um fibroblasto (Figura 6), aderentes em cultura e formadoras de colônias na primeira passagem. No entanto, o potencial proliferativo dessas células foi diferente (Figura 9).

O tratamento com CTAds normais e nocautes para receptor de IFN γ melhorou a resposta funcional, como observado pelos menores índices de creatinina e ureia sérica. Isso também é visto através das análises morfológicas, em que se notou a diminuição de NTA e o aumento da proliferação tubular observado por PCNA. Portanto, uma vez que o tecido encontra-se menos lesado, isso repercute na melhora da função renal. No entanto, é notável que a melhora vista no tratamento com CTAds nocautes para receptor de IFN γ não é tão eficaz quando comparado com o tratamento com CTAds normais.

Os mecanismos de ação das CTs mais aceito, atualmente, na literatura é a secreção de diversos fatores tróficos, como por exemplo, a IDO (Ryan, Barry et al. 2007). Esses fatores tróficos apresentam a capacidade de regular a resposta imune (Le Blanc and Ringden 2007; Humphreys and Bonventre 2008; Uccelli, Moretta et al. 2008) e, aumentar a proliferação de células T ou Tregs, após secreção de IDO (Shi, Hu et al. 2010). Com isso, é possível inferir que a menor eficácia no tratamento com CTAds nocautes para receptor de IFN γ ocorre, devido a ausência da secreção de IDO pelas CTAds IFN γ R KO.

Para buscar compreender como as células IFN γ R KO são menos responsivas, foi analisada a capacidade imunoreguladora das CTAds no tecido renal lesado; para isso, foi avaliado o padrão inflamatório do tecido. Pela técnica de Real Time PCR, foi feita a quantificação da expressão de mRNA de uma das citocinas inflamatórias padrão Th1 (Interleucina-6), e uma das citocinas protetoras padrão Th2 (Interleucina-10).

As interleucinas são proteínas que são sintetizadas por uma célula primária de produção, como por exemplo, linfócitos, monócitos e macrófagos. No entanto, também são sintetizadas por outros tipos celulares, tais como células do músculo liso, fibroblastos, astrócitos e células da microglia. Atualmente, tem-se conhecimento dos receptores celulares, locais cromossômicos e quantidade de aminoácidos presente em cada citocina. Como essas

proteínas não são estocadas, elas precisam ser sintetizadas e secretadas por suas células produtoras sempre que houver um estímulo. As citocinas apresentam vida-média curta, e no geral, uma das suas principais atividades biológicas é a comunicação entre as células (Kilpatrick L, Harris MC. 1998).

Kaminska e colegas (2007) demonstraram a presença de Interleucina-6 (IL-6) em rins de transplantados renais com lesão de IR (Kaminska, Tyran et al. 2007). Em 2007, Dong et al, mostraram que a suspensão celular oriunda de rins isquêmicos sintetizam IL-6 e IL-1 β , o que possivelmente está relacionado com a participação dos linfócitos como um mecanismo efetor na isquemia (Dong, Swaminathan et al. 2007). A inflamação sistêmica irá gerar estímulos para as células endoteliais, fibroblastos e monócitos/macrófagos desencadeando a síntese de IL-6, sendo estas células as principais fontes de tal citocina (Akdis, Burgler et al. 2011). Desse modo, a citocina pró-inflamatória IL-6 apresentará elevada expressão na lesão de isquemia.

No entanto, animais que sofreram a lesão isquêmica e foram tratados com CTAds controle apresentaram baixa expressão de IL-6 devido ao fato de que as células-tronco secretaram substâncias que reduzem tal expressão. A secreção de IL-10 e TGF- β pelas células-tronco irá reduzir a síntese de IL-6 (Taylor, Shacks et al. 1997) (Figura 16).

Já a Interleucina-10 (IL-10) é uma importante citocina imunoregulatória. Esta em determinadas circunstâncias tem um caráter anti-inflamatório, visto que uma de suas principais funções é inibir a resposta Th1, o que implica na inibição da produção de IL-12 e IFN γ (Del Prete, De Carli et al. 1993). A IL-10 está altamente envolvida na modulação de doenças alérgicas em humanos, na inibição da produção de IFN γ pelos macrófagos e células NK, inibição da expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD-28 e B7-1/2, indução da produção de citocina IL-4, e pela mudança de classe do anticorpo para IgG4 (Taylor, Shacks et al. 1997). Outra função dessa citocina é a limitação da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, IL-1 α e β , IL-6, IL-18, quimiocinas (IP-10, RANTES, MIP-2, MCP-1) e TNF- α (Taylor, Shacks et al. 1997). Através de seus efeitos sobre as células apresentadoras de antígenos, a IL-10 irá inibir a produção de citocinas e a proliferação de células T CD4 $^{+}$ (Akdis, Burgler et al. 2011).

A citocina IL-10 é secretada em humanos, principalmente, por monócitos, células B, macrófagos, células T (células T reguladoras, principalmente) e células dendríticas (DCs) (Akdis, Burgler et al. 2011). Outra fonte dessa citocina é a célula-tronco. Klyushnenkova e colaboradores, em 2005, demonstraram que a capacidade supressora das CTM está

relacionada com a síntese de citocinas solúveis, como por exemplo, a IL-10 (Klyushnenkova, Mosca et al. 2005). Dessa forma, esperava-se que a expressão de IL-10 fosse maior em animais tratados com CTAds selvagens. O tratamento com CTAd IFN γ R KO não aumenta a expressão de IL-10 nos rins dos animais. A secreção de IL-10 correlaciona-se com a expressão do receptor de IFN γ (Ryan, Barry et al. 2007). Em um ambiente inflamatório, a presença de IFN γ irá fazer com que as CTAds produzam prostaglandinas e IDO que depleta triptofano, gerando a inibição da proliferação de linfócitos (Chabannes, Hill et al. 2007). Assim, podemos correlacionar que na ausência de receptor de IFN γ , as CTAds nocautes não respondem ao estímulo inflamatório e por fim, acabam não exercendo suas funções imunomoduladoras (Figura 17).

Como as CTAds de animais nocautes, apesar de não diminuírem o processo inflamatório como as CTAds normais, ainda conseguem interferir na capacidade reparadora quando administradas no modelo de IR (diminuição das características funcionais e melhora nas características histológicas/NTA), buscou-se estudar o perfil proliferativo nessa terapia. Para isso, foi realizada a imunohistoquímica para PCNA; esta análise mostrou que o tratamento com CTAds normais apresenta mais núcleos em divisão celular do que o tratamento com CTAds nocautes. Dessa forma, o perfil regenerativo do tratamento com CTAds nocautes é menor que o tratamento com CTAds normais. O IFN γ é uma citocina que exerce um potente efeito antiproliferativo (Labeur, Refojo et al. 2008). Singh e colaboradores (2011) demonstraram em estudo realizado em fígado envelhecido, que em elevados níveis, o IFN γ torna-se um inibidor do ciclo celular, tendo um efeito prejudicial na resposta regenerativa (Singh, Goode et al. 2011). Desse modo, é possível sugerir, que o menor perfil regenerativo visto no tratamento com CTAds nocautes, seja reflexo da elevada concentração de IFN γ no tecido lesado.

Estudos atuais vêm relacionando o papel das CTMs na presença de tumores. Recentemente, foi demonstrado que CTMs migram para o estroma tumoral, assim como para o tecido lesado. Shinagawa e colaboradores (2010) examinaram o papel de CTMs humanas no estroma tumoral, utilizando um modelo de camundongo ortotópico com câncer de cólon. No experimento *in vivo*, os autores observaram que as CTMs migraram para o estroma tumoral ortotópico metastático, e diferenciam-se em carcinoma associado a fibroblastos. Além disso, estas células promoveram o crescimento e metástase do câncer de cólon pelo aumento da angiogênese, pela migração e pela invasão, e, também, pela inibição da apoptose das células tumorais (Shinagawa, Kitadai et al. 2010). A capacidade que as CTMs apresentam

de inibir a apoptose pode ser o fator que justifica a melhora no quadro de IRA, no tratamento com CTAds nocautes, já que a mesma não consegue agir de forma integral, devido a ausência do receptor de IFN γ .

Ainda, buscando correlacionar o porquê das CTAds IFN γ R KO serem menos responsivas, foi avaliada a capacidade proliferativa das CTAds *in vitro*. Para isso foi realizado ensaio de proliferação pela técnica de MTT. O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) pelas células. Este sal é reduzido em formazana, no interior da mitocôndria. A formazana será acumulada dentro da célula, sendo extraída através da adição de um solvente apropriado (dimetilsulfóxido) (Mosmann 1983). A análise das absorbâncias demonstraram que as CTAds normais apresentam capacidade proliferativa maior que as CTAds IFN γ R KO (Figura 9). Podemos sugerir que a ausência do receptor de IFN γ nas CTAds interfere no potencial proliferativo *per se* dessas células, podendo causar diminuição do potencial terapêutico das mesmas.

8. Conclusão

As CTAds de animais selvagens e nocautes para o receptor IFN γ são facilmente obtidas da gordura inguinal dos animais, e possuem perfil similar quanto aos marcadores de superfície. Ambas as células apresentam perfil imunofenotípico e capacidade de diferenciação semelhantes, apesar de haver pequenas diferenças não significativas.

Com relação à proliferação celular em cultura, as CTAds de animais nocautes apresentam menor capacidade proliferativa quando comparadas com CTAds selvagens.

No modelo de lesão renal aguda, as CTAds nocautes para o receptor IFN γ levam a uma menor proteção funcional (níveis de ureia e creatinina sérica) quando comparadas as CTAds normais administradas no modelo experimental. As análises morfológicas mostraram que animais tratados com CTAds normais apresentam necrose tubular aguda em grau I, II e III, já os animais tratados com CTAds nocaute para IFN γ apresentam grau I, III e IV, além disso, animais tratados com CTAds normais apresentam maior aumento da proliferação tubular observado por PCNA, que os animais tratados com CTAds nocaute para IFN γ .

O tratamento com CTAds nocautes para o receptor IFN γ leva a uma menor imunomodulação no tecido renal (IL-6 e IL-10) quando comparados com o de CTAds normais.

O receptor de IFN γ nas CTAds é de extrema importância para o mecanismo de ação imunomodulador e proliferativo, uma vez que o balanço Th1/Th2 e capacidade de proliferação no modelo animal não é observado no tratamento com CTAds nocautes para o receptor IFN γ . Ainda, receptor de IFN γ parece ser importante para a proliferação da CTAd *per se*.

9. Referências Bibliográficas

- Aggarwal, S. and M. F. Pittenger (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." Blood **105**(4): 1815-22.
- Aires, M. *Fisiologia*, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- Akca, A., Q. Nguyen, et al. (2009). "Mediators of inflammation in acute kidney injury." Mediators Inflamm **2009**: ID:137072. (Review article)
- Akdis, M., S. Burgler, et al. (2011). "Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases." J Allergy Clin Immunol **127**(3): 701-21 e1-70.
- Bonventre, J. V. (1993). "Mechanisms of ischemic acute renal failure." Kidney Int **43**(5): 1160-78.
- Bonventre, J. V. and A. Zuk (2004). "Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?" Kidney Int **66**(2): 480-5.
- Brezis, M. and F. H. Epstein (1993). "Cellular mechanisms of acute ischemic injury in the kidney." Annu Rev Med **44**: 27-37.
- Campagnoli, C., I. A. Roberts, et al. (2001). "Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow." Blood **98**(8): 2396-402.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-50.
- Caplan, A. I. (2009). "Why are MSCs therapeutic? New data: new insight." J Pathol **217**(2): 318-24.
- Cassola, A. C. Atualização em Fisiologia e fisiopatologia renal: Canais iônicos na células do epitélio tubular renal. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, São Paulo, v. 22, n. 3, p.176-180, 2000.
- Chabannes, D., M. Hill, et al. (2007). "A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells." Blood **110**(10): 3691-4.
- Chen, J., Y. Li, et al. (2001). "Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats." Stroke **32**(4): 1005-11.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." Arthritis Rheum **44**(8): 1928-42.
- Del Prete, G., M. De Carli, et al. (1993). "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production." J Immunol **150**(2): 353-60.
- Delamarche, P. et al. *Anatomia, fisiologia e biomecânica*. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 2006.

- Denker, H. W. (2006). "Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources." J Med Ethics **32**(11): 665-71.
- Devine, S. M., C. Cobbs, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates." Blood **101**(8): 2999-3001.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, et al. (2002). "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli." Blood **99**(10): 3838-43.
- Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-7.
- Douglas, C. R. *Tratado de fisiologia aplicada a saúde*. 5.ed. São Paulo: Robe Editorial, 2002. 167 p.
- Dong, X., S. Swaminathan, et al. (2007). "Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury." Kidney Int **71**(7): 619-28.
- DuBose, T. D., Jr., D. G. Warnock, et al. (1997). "Acute renal failure in the 21st century: recommendations for management and outcomes assessment." Am J Kidney Dis **29**(5): 793-9.
- Erices, A., P. Conget, et al. (2000). "Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood." Br J Haematol **109**(1): 235-42.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, et al. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.
- Gimble, J. M. (2003). "Adipose tissue-derived therapeutics." Expert Opin Biol Ther **3**(5): 705-13.
- Gimble, J. M., A. J. Katz, et al. (2007). "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine." Circ Res **100**(9): 1249-60.
- Giordano, A., U. Galderisi, et al. (2007). "From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells." J Cell Physiol **211**(1): 27-35.
- Hoste, E. A., G. Clermont, et al. (2006). "RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis." Crit Care **10**(3): R73.
- Humphreys, B. D. and J. V. Bonventre (2008). "Mesenchymal stem cells in acute kidney injury." Annu Rev Med **59**: 311-25.
- In 't Anker, P. S., S. A. Scherjon, et al. (2003). "Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation." Blood **102**(4): 1548-9.
- Kaminska, D., B. Tyran, et al. (2007). "Cytokine gene expression in kidney allograft biopsies after donor brain death and ischemia-reperfusion injury using in situ reverse-transcription polymerase chain reaction analysis." Transplantation **84**(9): 1118-24.

- Kellum, J. A. (2008). "Acute kidney injury." Crit Care Med **36**(4 Suppl): S141-5.
- Kellum, J. A., M. Leblanc, et al. (2008). "Acute renal failure." Clin Evid (Online) **2008**.
- Kilpatrick L., Harris M. C. Cytokines and the inflammatory response. In: Polin RA, Fox WW, Fletcher J. Fetal and Neonatal Physiology. 2^a ed. Filadélfia: W.B. Saunders; 1998. p. 1967-79.
- Kinsey, G. R., L. Li, et al. (2008). "Inflammation in acute kidney injury." Nephron Exp Nephrol **109**(4): e102-7.
- Klyushnenkova, E., J. D. Mosca, et al. (2005). "T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression." J Biomed Sci **12**(1): 47-57.
- Kondo, K., S. Shintani, et al. (2009). "Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(1): 61-6.
- Krampera, M., L. Cosmi, et al. (2006). "Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells." Stem Cells **24**(2): 386-98.
- Kroshian, V. M., A. M. Sheridan, et al. (1994). "Functional and cytoskeletal changes induced by sublethal injury in proximal tubular epithelial cells." Am J Physiol **266**(1 Pt 2): F21-30.
- Kuhbier, J. W., B. Weyand, et al. (2010). "Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells." Adv Biochem Eng Biotechnol **123**: 55-105.
- Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani, et al. (2001). "Circulating skeletal stem cells." J Cell Biol **153**(5): 1133-40.
- Labeur, M., D. Refojo, et al. (2008). "Interferon-gamma inhibits cellular proliferation and ACTH production in corticotroph tumor cells through a novel janus kinases-signal transducer and activator of transcription 1/nuclear factor-kappa B inhibitory signaling pathway." J Endocrinol **199**(2): 177-89.
- Le Blanc, K. and O. Ringden (2007). "Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience." J Intern Med **262**(5): 509-25.
- Liano, F. and J. Pascual (1996). "Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group." Kidney Int **50**(3): 811-8.
- Lieberthal, W. (1997). "Biology of acute renal failure: therapeutic implications." Kidney Int **52**(4): 1102-15.
- Mazo, M., V. Planat-Benard, et al. (2008). "Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction." Eur J Heart Fail **10**(5): 454-62.
- Mehta, R. L., J. A. Kellum, et al. (2007). "Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury." Crit Care **11**(2): R31.

- Moitra, K., H. Lou, et al. (2011). "Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development." Clin Pharmacol Ther **89**(4): 491-502.
- Molitoris, B. A. Cellular basis of ischemic acute renal failure. In: *Acute Renal Failure* (3rd ed.), edited by J. M. Lazarus and B. M. Brenner. New York: Churchill Livingstone, 1993, p. 1-32
- Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem cells and their niches." Science **311**(5769): 1880-5.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Myers, B. D. and S. M. Moran (1986). "Hemodynamically mediated acute renal failure." N Engl J Med **314**(2): 97-105.
- Nauta, A. J. and W. E. Fibbe (2007). "Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells." Blood **110**(10): 3499-506.
- Netter, F. H. *Kidneys, ureters, and urinary bladder: depicting anatomy and embryology, physiology, pathology, pathophysiology, and clinical features and treatment of diseases*. New Jersey: CIBA, 1973. 295 p.
- Paller, M. S. (1998). "Acute renal failure: controversies, clinical trials, and future directions." Semin Nephrol **18**(5): 482-9.
- Phinney, D. G. and D. J. Prockop (2007). "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views." Stem Cells **25**(11): 2896-902.
- Pinheiro, H. S., N. O. Camara, et al. (2007). "Contribution of CD4+ T cells to the early mechanisms of ischemia- reperfusion injury in a mouse model of acute renal failure." Braz J Med Biol Res **40**(4): 557-68.
- Ramalho-Santos, M. and H. Willenbring (2007). "On the origin of the term "stem cell"." Cell Stem Cell **1**(1): 35-8.
- Ryan, J. M., F. Barry, et al. (2007). "Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells." Clin Exp Immunol **149**(2): 353-63.
- Sato, K., K. Ozaki, et al. (2007). "Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells." Blood **109**(1): 228-34.
- Scannell, G. (1996). "Leukocyte responses to hypoxic/ischemic conditions." New Horiz **4**(2): 179-83.
- Semedo, P., M. Correa-Costa, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model." Stem Cells **27**(12): 3063-73.

- Semedo, P., C. G. Palasio, et al. (2009). "Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury." Int Immunopharmacol **9**(6): 677-82.
- Semedo, P., P. M. Wang, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells ameliorate tissue damages triggered by renal ischemia and reperfusion injury." Transplant Proc **39**(2): 421-3.
- Shi, Y., G. Hu, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair." Cell Res **20**(5): 510-8.
- Shinagawa, K., Y. Kitadai, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer." Int J Cancer **127**(10): 2323-33.
- Singh, P., T. Goode, et al. (2011). "Elevated interferon gamma signaling contributes to impaired regeneration in the aged liver." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **66**(9): 944-56.
- Spees, J. L., S. D. Olson, et al. (2003). "Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2397-402.
- Sujata, L. and S. Chaudhuri (2008). "Stem cell niche, the microenvironment and immunological crosstalk." Cell Mol Immunol **5**(2): 107-12.
- Taylor, S. C., S. J. Shacks, et al. (1997). "Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients." J Natl Med Assoc **89**(11): 753-7.
- Thadhani, R., M. Pascual, et al. (1996). "Acute renal failure." N Engl J Med **334**(22): 1448-60.
- Thurman, J. M. (2007). "Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion." Clin Immunol **123**(1): 7-13.
- Togel, F., K. Weiss, et al. (2007). "Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **292**(5): F1626-35.
- Tondreau, T., N. Meuleman, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity." Stem Cells **23**(8): 1105-12.
- Uccelli, A., L. Moretta, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells in health and disease." Nat Rev Immunol **8**(9): 726-36.
- Wen, X., R. Murugan, et al. (2010). "Pathophysiology of acute kidney injury: a new perspective." Contrib Nephrol **165**: 39-45.
- Willinger, C. C., H. Schramek, et al. (1992). "Tissue distribution of neutrophils in postischemic acute renal failure." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **62**(4): 237-43.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell **13**(12): 4279-95.