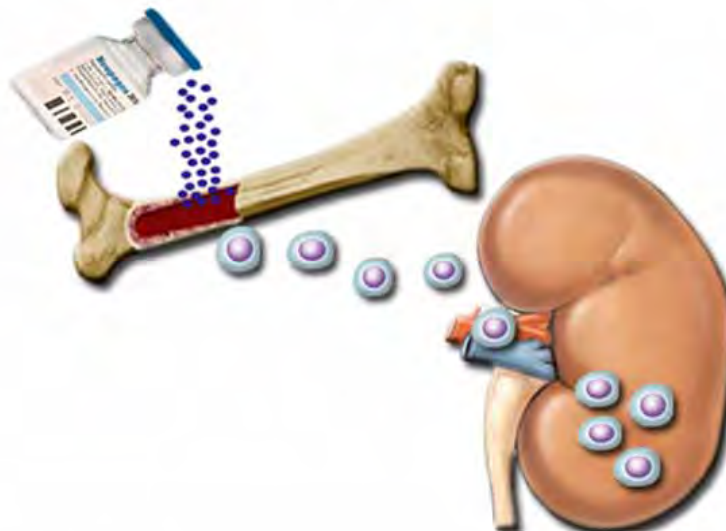

Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"



Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica

Efeito sobre função renal de estimulantes de progenitores hematopoiéticos na nefropatia por adriamicina^{1,2,3}



Luís Gustavo Modelli de Andrade
Botucatu - 2011

1- Tese apresentada ao curso de Pós-graduação "Fisiopatologia em Clínica Médica" - Área de concentração em Nefrologia para obtenção do título de doutor.

2- Orientadora: Prof. Dra. Maria Fernanda Cordeiro de Carvalho.

3- Auxílio a pesquisa da Fundação para o desenvolvimento da Unesp (Fundunesp)

Luís Gustavo Modelli de Andrade

**Efeito sobre função renal de estimulantes
de progenitores hematopoiéticos na
nefropatia por adriamicina**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação “Fisiopatologia em Clínica Médica” – Área de concentração em Nefrologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para a obtenção do título de doutor.

**Orientadora: Prof. Dra. Maria Fernanda Cordeiro
de Carvalho**



**Faculdade de Medicina de Botucatu
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Andrade, Luís Gustavo Modelli de.

Efeito sobre função renal de estimulantes de progenitores hematopoiéticos na nefropatia por adriamicina / Luís Gustavo Modelli de Andrade. – Botucatu, 2011

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientadora: Maria Fernanda Cordeiro de Carvalho

Capes: 40101134

1. Células-tronco. 2. Nefrologia. 3. Insuficiência renal crônica.

Palavras chave: Células-tronco; Eritropoetina; Fatores de tropismo; Granuloquine; Insuficiência renal crônica.

**Este Trabalho foi financiado com recursos de
auxílio à pesquisa da Fundação para o
desenvolvimento da UNESP (Fundunesp)
processo 803/07 - DFP**

Este trabalho é dedicado a:

Vanessa Cristina Pelícia de Andrade, esposa que sempre me incentivou e soube compreender os momentos de ausência.

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a participação e auxílio de diversas pessoas as quais expresso minha imensa gratidão:

A **Prof. Dra. Maria Fernanda Cordeiro de Carvalho**, orientadora desta tese, pela participação ativa, pelo convívio diário e pelo ensino e dedicação na arte do transplante renal.

A **Prof. Dra. Rosa Marlene Viero**, co-orientadora deste trabalho, pela ajuda na elaboração do projeto e interpretação dos resultados histológicos.

Aos técnicos do departamento de patologia: **Marcos Roberto Franchi e Celene M. Carvalho Grandin**, pela realização das análises de imunohistoquímica.

A **Irene Aliano Ortiz**, secretária do transplante renal, pela ajuda no trabalho diário e dedicação.

Ao **Prof. Dr. José Roberto Sartori** do departamento de melhoramento e nutrição animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu, pelo gentil empréstimo do microscópio e do analisador de imagens.

Agradecimentos

Aos médicos nefrologistas e colegas de trabalho, **Prof. Dr. André Luis Balbi, Prof. Dr. Luis Cuadrado Martin, Prof. Dra. Jacqueline Teixeira Caramori, Prof. Dr. Pasqual Barretti, Prof. Dra. Daniela Ponce, Prof. Dra. Vanessa Santos Silva, Dr. Alexandre Carvalho Pinto Coelho e Dr. João Henrique Castro.**

Aos técnicos do Laboratório Experimental da Disciplina de Nefrologia: **José Carlos Georgette, Sandra Angela Fábio e Mário Batista Bruno** pela ajuda na execução do experimento.

A todos, muito obrigado.

Lista de Abreviaturas Utilizadas (ordem alfabética)

AKT	Serine/threonine protein kinase
ATP	Adenosine triphosphate
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
BrdU	Bromodeoxyuridine
CD105	Marcador de célula-tronco mesenquimal (endoglina)
CD133	Marcador de célula-tronco
CD29	Marcador de célula-tronco mesenquimal (integrina $\beta 1$)
CD34	Marcador de célula-tronco hematopoiética endotelial
CD44	Marcador de célula-tronco mesenquimal (Pgp1, HCAM-1)
CD45	Marcador de célula-tronco hematopoiética
CD73	Marcador de célula-tronco mesenquimal (Sh3)
CD90	Marcador de célula-tronco mesenquimal (Thy-1)
cIAP-2	Inhibitor of apoptosis protein
c-kit	Marcador de célula-tronco hematopoiética (receptor de tirosina-quinase)
DAB	Diaminobenzidine
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EPC	Célula-tronco progenitora endotelial
EPO	Eritropoetina humana recombinante
EPO-r	Receptor de eritropoetina
Flk-1	FMS-like tyrosine kinase-1 (sinônimo de VEGF-R2)
FOXO3	Forkhead Box O3
FoxP3	Forkhead Box P3
G	Grupo granuloquine

G+EPO	Grupo granuloquine somando a eritropoetina
Gadd45β	Growth Arrest and DNA damage
G-CSF	Fator estimulante de colônias granulocíticas (granuloquine)
GESF	Glomeruloesclerose segmentar e focal
HE	Hematoxilina-eosina
HF-1	Hypoxia-inducible growth factor 1
HO-1	Heme oxygenase 1
HRP	Horseradish Peroxidase
HSC	Célula-tronco progenitora hematopoiética
HSP-70	Heat Shock protein 70
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IH	Imunohistoquímica
IL-1	Interleuckin 1
IL-10	Interleuckin 10
IL-12	Interleuckin 12
IL-18	Interleuckin 18
INF-α	Interferon α
IRA	Insuficiência renal aguda
IRC	Insuficiência renal crônica
Jak/STAT	Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription
JAK-2	Janus Kinase 2
Lin	Lineage
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemotacting protein-1
M-CSF	Fator estimulante de colônias macrocíticas
MSC	Célula-tronco progenitora mesenquimal
NF-$\kappa\beta$	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK	Células “natural-killer”
NO	Nitric oxide
Oct-4	Octamer-4 (POU5F1)
Pax-2	Paired Box gene 2
PBS	Phosphate buffered saline
PGE-2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIGF	Placenta growth factor
Sca1	Marcador de célula-tronco hematopoiética (Ly6A/E)
SCF	Fator estimulante de células-tronco
STAT-5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5A
TGF-β	Transforming growth factor- β
Th2	Grupo de linfócitos da subpopulação 2
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R2	Vascular endothelial growth factor – receptor 2
XIAP	X-linked Inhibitor of apoptosis protein

Lista das Tabelas

Tabela	Título	Pág
1	Peso médio inicial (gramas) dos animais sobreviventes até o momento do sacrifício nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).	42
2	Peso médio final em gramas dos animais nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).	43
3	Peso médio renal ao fim do estudo em gramas dos animais nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).	45
4	Creatinina ao fim do estudo (mg/dL) nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).	46
5	Albumina ao fim do estudo (g/dL) nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).	48
6	Número de áreas de atrofia nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). * $p < 0,001$ x adriamicina.	49
7	Percentagem de esclerose glomerular nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). * $p < 0,001$ x adriamicina.	51
8	Intensidade da Fibrose Intersticial nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). * $p = 0,019$ x adriamicina.	52
9	Área total média de expressão de Sca1 nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO. * $p < 0,0001$ x adriamicina.	59

10	Área total média de expressão de CD105 nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). * $p < 0,0001$ x adriamicina e granuloquine.	61
11	Área total média de expressão de CD34 nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). * $p < 0,0001$ x adriamicina.	63

Lista das Figuras

Tabela	Título Resumido	Pág
1	Divisão de linhagens de células-tronco na medula.	6
2	Papel das células-tronco endógenas, exógenas e do fator G-CSF (fator de “homing”) na recuperação da lesão tubular aguda.	15
3	Provável mecanismo de ação dos fatores de tropismo para células-tronco hematopoiéticas na lesão renal aguda.	22
4	Delineamento nos diversos grupos de estudo.	33
5	Peso médio inicial e final dos animais nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). * $p=0,001$ x peso inicial	44
6	Peso médio renal ao fim do estudo em gramas nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).	45
7	Creatinina ao fim do estudo (mg/dL) nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).	47
8	Albumina média ao fim do estudo (g/dL) nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).	48
9	Número de áreas de atrofia nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). $p<0,001$ nos grupos granuloquine, EPO e G+EPO x adriamicina.	50
10	Porcentagem de esclerose glomerular nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). $p<0,001$ nos grupos granuloquine, EPO e G+EPO x adriamicina.	51
11	Intensidade da Fibrose Intersticial nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO	53

Lista das Figuras

	(granuloquine + eritropoetina).* p=0,019 nos grupos granuloquine, EPO e G+EPO x adriamicina.	
12	Aspecto histológico dos rins ao fim do estudo no grupo controle (adriamicina sem tratamento)	55-56
13	Aspecto histológico dos rins ao fim do estudo nos grupos de tratamento (granuloquine, EPO ou G+EPO)	57-58
14	Área Total de expressão de Sca1/LyA6 nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). p<0,001 nos grupos granuloquine, EPO e G+EPO x adriamicina.	60
15	Área Total de expressão de CD105 nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). p<0,001 nos grupos EPO e G+EPO x adriamicina e granuloquine.	62
16	Área Total de expressão de CD34 nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). p<0,001 nos grupos granuloquine, EPO e G+EPO x adriamicina.	63
17	Imagens de imunohistoquímica para os reagentes CD34, CD105 e Sca1 (IH 400x).	65
18	Correlação entre a área de expressão de CD34 e a área de expressão de Sca1 em μm^2 em todos os animais do estudo sem divisão por grupos (coeficiente de pearson=0,785; p<0,0001).	66
19	Correlação entre a área de expressão de Sca1 e a área de expressão de CD105 em μm^2 em todos os animais do estudo sem divisão por grupo (coeficiente de pearson=0,583; p=0,003).	67
20	Correlação entre a área de expressão de CD34 e a área de expressão de CD105 em μm^2 em todos os animais do estudo sem divisão por grupo (coeficiente de pearson=1; p=NS).	68
21	Correlação de parâmetros histológicos com a expressão de CD34. A) Correlação do número de áreas de atrofia com CD34 (pearson=-0,751; p<0,0001). B) Percentagem de	69

	esclerose glomerular e expressão de CD34 (pearson=-0,745; p<0,0001). C) Intensidade da fibrose intersticial com a expressão de CD34 (pearson=-0,637; p=0,001).	
22	Correlação de parâmetros histológicos com a expressão de Sca1. A) Correlação do número de áreas de atrofia com Sca1 (pearson=-0,70; p<0,0001). B) Percentagem de esclerose glomerular e expressão de Sca1 (pearson=-0,586; p<0,003). C) Intensidade da fibrose intersticial com a expressão de Sca1 (pearson=-0,565; p=0,004).	70
23	Correlação de parâmetros histológicos com a expressão de CD105. A) Correlação do número de áreas de atrofia com CD105 (pearson=-0,397; p=0,055). B) Percentagem de esclerose glomerular e expressão de CD105 (pearson=-0,265; p=NS). C) Intensidade da fibrose intersticial com a expressão de CD105 (pearson=-0,288; p=NS).	71
24	Mecanismo de Ação do G-CSF.	97
25	Efeito de citoproteção da Eritropoetina (EPO) através da inibição da apoptose celular pela ativação da Janus quinase 2 (JAK2).	100

Resumo

Introdução: O granuloquine (G-CSF) e a Eritropoetina (EPO) são hoje reconhecidos, além de suas ações clássicas, como estimulantes para células-tronco. Estas por sua vez, possuem um papel benéfico na regeneração direta dos tecidos lesados e/ou por ação endócrina/parácrina. **Objetivo:** Avaliar o efeito do granuloquine e da eritropoetina no modelo de lesão renal crônica da adriamicina. **Materiais e Métodos:** Modelo experimental em 40 camundongos BALB/c inoculados com adriamicina e divididos em 4 grupos: grupo controle (adriamicina sem tratamento), grupo granuloquine (tratado com G-CSF 250µg/kg/dia por 5 dias subcutâneo), grupo eritropoetina (tratados com EPO na dose de 4000UI/kg no primeiro dia seguido de 1.000UI nos demais 4 dias subcutâneo) e grupo G+EPO (ambos os tratamentos combinados nas mesmas doses). Ao fim de 6 semanas os animais foram sacrificados para a realização de análises bioquímicas, histológicas e de imunohistoquímica. **Resultados:** Não houve diferenças na mortalidade e nos parâmetros bioquímicos avaliados (creatinina e albumina) entre os grupos. Houve melhora dos parâmetros histológicos com redução do número de áreas de atrofia, menor intensidade de fibrose e redução da percentagem de esclerose glomerular em todos os grupos de tratamento com relação ao

controle. Também observamos aumento de progenitores hematopoiéticos (Sca1) e endoteliais (CD34) em todos os grupos de tratamento (G-CSF, EPO e G+EPO). Os progenitores mesenquimais (CD105) estavam aumentados nos grupos EPO e G+EPO. Correlacionamos a melhora dos parâmetros histológicos com os progenitores hematopoiéticos (Sca1 e CD34).

Discussão: Observamos significativa melhora nos parâmetros histológicos dos animais tratados com fatores estimulantes de células-tronco (EPO e G-CSF). Não houve efeito aditivo dos fatores (grupo G+EPO semelhante aos grupos com os fatores isolados). Atribuímos os efeitos benéficos à migração de células-tronco principalmente das linhagens hematopoiéticas.

Conclusão: Os resultados positivos obtidos na histologia encorajam estudos adicionais da eritropoetina e do granuloquine como alternativas de tratamento para a doença renal crônica.

Índice

Introdução.....	1
Insuficiência Renal Crônica – A magnitude do problema	1
Terapia Celular – Contribuição no reparo da lesão renal.....	3
Terapia Celular – Tipos de Células-Tronco.....	5
Células-Tronco Adultas Hematopoiéticas	8
Infusão de células progenitoras endoteliais exógenas.....	9
Infusão de células-tronco hematopoiéticas exógenas	9
Células-tronco Adultas Mesenquimais	10
Infusão de células-tronco mesenquimais exógenas	11
Fatores de migração de células-tronco	14
Fatores de Migração de células-tronco: G-CSF.....	16
Fatores de Migração de células-tronco: Outros Fatores.....	20
Fatores de Migração de células-tronco e a Mobilização de células progenitoras endoteliais	21
Fatores de Migração de células-tronco: Eritropoetina	23
Fatores de Migração de células-tronco: Eritropoetina	23
Modelos de Insuficiência Renal Crônica.....	26
Modelos de Insuficiência Renal Crônica - Nefropatia Induzida pela Adriamicina	27
Objetivos	29
Materiais e Métodos.....	30
Modelo de Lesão renal.....	30
Delineamento dos Grupos.....	31
Análises Bioquímicas	35
Avaliação Morfológica	35
Análise de Imunohistoquímica	36
Análise Estatística	41
Resultados.....	42
Análises Bioquímicas	46
Análises Histológicas	49
Análises de Imunohistoquímica	59
Correlações.....	66
Discussão	72
Efeito dos Fatores de Tropismo sobre a Função renal e albumina	73

Índice

Efeito dos Fatores de Tropismo sobre a lesão renal – parâmetros histológicos	76
Efeito dos Fatores de Tropismo sobre a migração de células-tronco.....	81
Células-Tronco Adultas extra-medula	89
Outras Ações dos Fatores de Tropismo: G-CSF	93
Outras Ações dos Fatores de Tropismo: Eritropoetina.....	98
<i>Conclusão</i>	<i>104</i>
<i>Referências.....</i>	<i>106</i>

Introdução

Insuficiência Renal Crônica – A magnitude do problema

As doenças renais crônicas são um problema de saúde pública mundial com progressivo aumento em sua incidência. Nos Estados Unidos a prevalência de doença renal crônica tem aumentado a uma taxa de 6 a 8% ao ano, em grande parte, devido a elevação no número de casos de diabetes e hipertensão arterial(1). Na América latina a prevalência de doença renal crônica também é alta e atribuída ao aumento da expectativa de vida e do número de casos de diabetes tipo 2. Cerca de 21% da população do Chile apresenta alteração na função renal (clearance de creatinina < 80ml/min); proteinúria foi detectada em 8,6% dos Argentinos, 14,2% dos Chilenos e 9,2% nos Mexicanos(2). No Brasil, um estudo realizado em uma grande capital do país, mostrou uma prevalência de 30% de hematúria e 6% de proteinúria em voluntários que se apresentaram para uma campanha de prevenção da doença renal(3). Lugon et al., estimaram a prevalência de doença renal crônica no Brasil no ano de 2007 em aproximadamente 540

casos por milhão de habitantes e calcularam em 15 milhões o número de brasileiros com insuficiência renal crônica (clearance de creatinina < 60ml/min)(4). Pela análise destes dados podemos estimar que uma parcela significativa da população mundial apresente alterações da função renal. Com o aumento da expectativa de vida e dos fatores de risco tradicionais observamos, hoje, uma elevação nos casos de insuficiência renal. Estratégias de rastreamento para detecção precoce como a campanha “previna-se”(5) são de fundamental importância para o manejo da doença renal em tempo adequado. Porém, até mesmo com a melhoria das políticas de saúde pública e o acesso da população a tratamentos que incluam medidas de nefroproteção, em uma boa parcela a lesão renal progredirá evoluindo para necessidade de terapia de substituição renal. Essa realidade é constatada ao observarmos o progressivo aumento no número de pacientes em terapia renal substitutiva no mundo e na América Latina(6). Dado o exposto, não parece ser possível até o momento bloquear completamente a evolução das nefropatias.

Terapia Celular – Contribuição no reparo da lesão renal

Devido à elevada prevalência das doenças renais crônicas, alternativas de tratamento como as terapias celulares são hoje motivos de estudo. As células-tronco já demonstram efeitos promissores em experimentos com animais e em ensaios clínicos com seres humanos para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva(7), infarto agudo do miocárdio(8) e doença de Parkinson(9). Para o rim as células-tronco adultas parecem também exercer efeitos protetores pela sua capacidade em regenerar o tecido lesado diferenciando-se em túbulos, capilares e células do glomérulo. Os estudos ainda estão em fase de experimentação com animais embora apresentem resultados promissores(10).

Vários estudos comprovam a participação das células-tronco no reparo do tecido renal demonstrando sua ação na reparação de túbulos(11), células endoteliais(12) e células mesangiais dos glomérulos(13). Poulsom et al., utilizando camundongos fêmeas, que receberam transplante de medula de camundongos machos, demonstraram a presença de células tubulares com cromossomo Y, por técnica de hibridização, nos rins desses animais sugerindo diferenciação de células-tronco circulantes em túbulos(11). Ikarashi et al., através de transplante de células-tronco marcadas com proteínas fluorescentes

no modelo de glomerulonefrite anti-Thy-1.1, encontraram as células marcadas no endotélio dos glomérulos sugerindo sua diferenciação em células endoteliais(12). De forma semelhante, Masuya et al., demonstraram que a infusão de células-tronco hematopoiéticas, também marcadas com proteínas fluorescentes, foram encontradas no mesangio dos glomérulos indicando sua diferenciação em células mesangiais(13). Assim, evidências experimentais apontam para um efeito direto das células-tronco na regeneração de túbulos, células endoteliais e mesangiais dos glomérulos.

Recentemente, entretanto, as observações de outros pesquisadores mostraram que nem sempre as células-tronco adultas agem através de mecanismos de diferenciação diretos como os mencionados acima e que sua ação deve-se mais a produção de fatores protetores por via endócrina/parácrina do que pela diferenciação nas células lesadas(14). Assim não está claro o mecanismo exato do benefício das células-tronco para o tecido renal, porém seja pela diferenciação direta, seja por ação de fatores locais elas parecem exercer proteção.

Terapia Celular – Tipos de Células-Tronco

Dentre os tipos de células-tronco estudadas para o tratamento da lesão renal figuram as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas(15). Por razões éticas e legais os estudos com células-tronco embrionárias são restritos devido aos potenciais problemas gerados pela manipulação de células embrionárias humanas. Outro obstáculo é a capacidade destas células em transformar-se em teratomas(16). Assim, as células-tronco adultas são mais utilizadas na prática devido a facilidade de obtenção, presença abundante na medula óssea e também pela presença em tecido extra-medula (ex. rim e fígado)(17).

As células-tronco adultas dividem-se em duas grandes linhagens: as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais(18). A linhagem hematopoiética originará as células sanguíneas e a linhagem mesenquimal pode originar outros tipos celulares como condrócitos e osteócitos (Figura 1). A localização preferencial destas células é na medula óssea, entretanto, alguns estudos recentes tem apontado a existência de células-tronco adultas em tecidos extra-medula como o tecido renal(19).

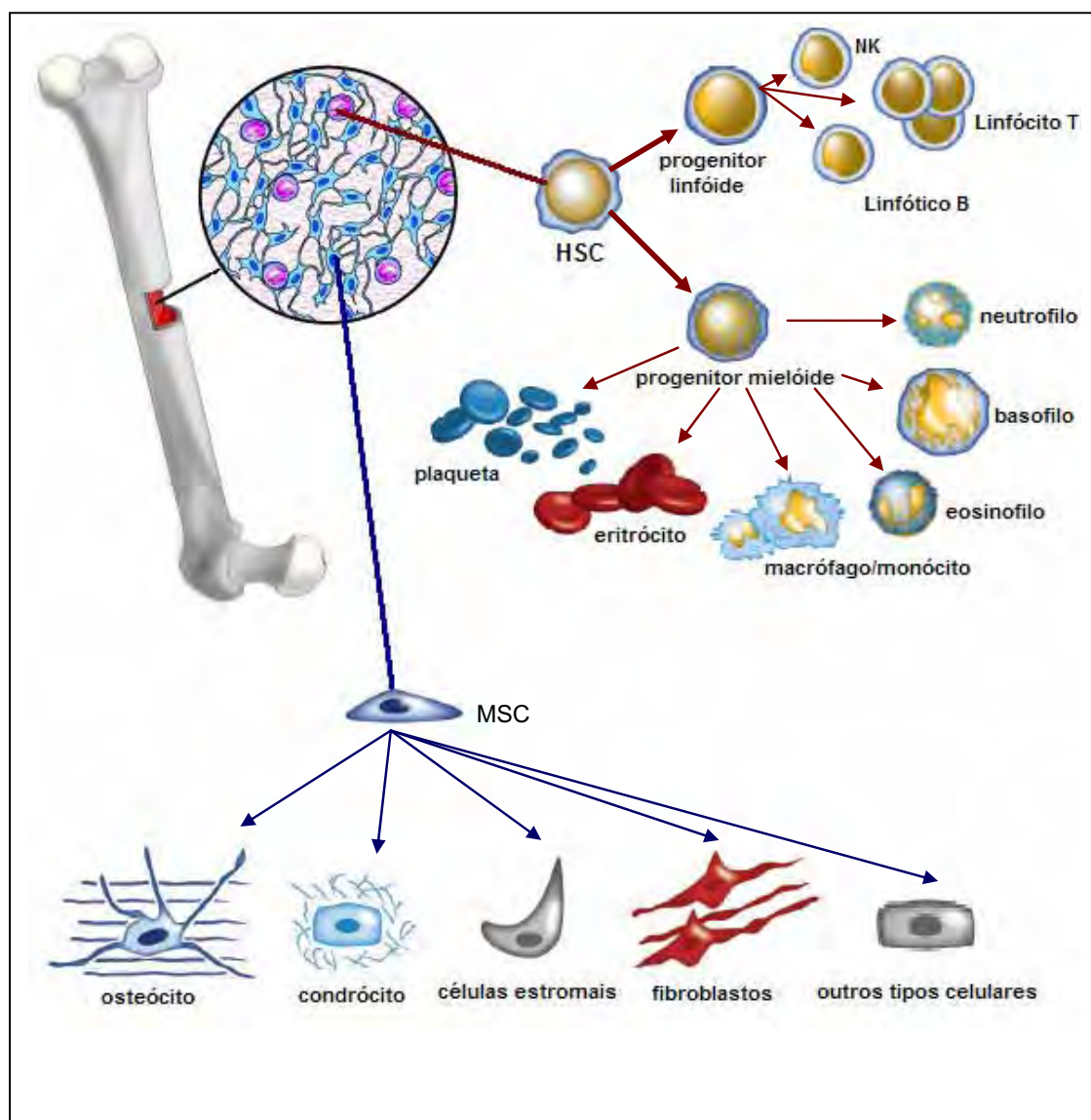


Figura 1. Divisão de linhagens de células-tronco na medula. As células-tronco hematopoiéticas (HSC) dão origem aos progenitores linfóides e aos progenitores mielóides. Os progenitores linfóides dão origem às células “natural killer” (NK), linfócitos T e linfócitos B. Os progenitores mielóides dão origem aos neutrófilos, basófilos, macrófagos, eosinófilos e aos eritrócitos e plaquetas. Do estroma da medula óssea, as células mesenquimais (MSC) dão origem a osteócitos, condrócitos, células estromais e fibroblastos. Outros tipos celulares também podem se originar das células mesenquimais como tecido muscular, hepático e renal.

Para o estudo terapêutico destas células alguns trabalhos avaliaram a infusão de células-tronco da medula e outros o papel das células-tronco existente no próprio rim.

Para os experimentos realizados com transplante de células-tronco adultas da medula podemos usar diferentes técnicas de rastreamento para assegurar a origem das células-tronco como provenientes do doador. Estas técnicas envolvem a conjugação com proteínas fluorescentes(12;13) ou a presença de cromossomo Y usando doador de sexo masculino em receptor de sexo feminino(11).

Outros estudos identificaram linhagens de células-tronco adultas presentes no próprio tecido renal como responsáveis pela recuperação em caso de agressão. Estas células foram encontradas em diferentes compartimentos renais como a papila, interstício, glomérulo e túbulos proximais(19-21).

Células-Tronco Adultas Hematopoiéticas

As células hematopoiéticas são precursoras de células sanguíneas (eritrócitos e leucócitos), entretanto, elas podem apresentar uma maior plasticidade diferenciando-se em células do trato gastrointestinal, pele, fígado e pulmão(22). Estas células são encontradas na medula óssea (Figura 1) onde correspondem a 0,05 a 0,5% do total. Também foram encontradas no sangue periférico e no sangue do funículo umbilical(23).

As células-tronco hematopoiéticas podem ser reconhecidas pela expressão de marcadores de superfície como CD45 e c-Kit (receptor de tirosina quinase) e Sca-1 (uma glicoproteína de membrana)(24). Recentemente foi descoberta uma linhagem derivada das células hematopoiéticas denominadas de células progenitoras endoteliais. Estas células expressam marcadores em conjunto com as hematopoiéticas e outros marcadores específicos como CD34, CD133 e VEGF-R2 conhecido também como Flk-1(24-26).

Assim as linhagens puramente hematopoiéticas são positivas para c-Kit⁺ e Sca-1⁺ e negativas para CD34⁻ e Flk-1⁻(27). Já as linhagens progenitoras endoteliais expressam CD34⁺, Flk1⁺ e em fases iniciais CD133⁺.

Infusão de células progenitoras endoteliais exógenas

Os estudos com a infusão de células progenitoras endoteliais para o tratamento da lesão renal ainda estão em fase inicial de investigação(25). Esse tipo celular tem a capacidade de regenerar vasos lesados através da diferenciação em células endoteliais ou células da camada muscular durante o processo de neovascularização(24;28). Uchimura et al., demonstraram em modelo de glomerulonefrite anti-Thy1.1, que a administração de células progenitoras endoteliais promoveu aumento do endotélio nos capilares glomerulares dos animais tratados reduzindo, assim, a lesão endotelial(29).

Infusão de células-tronco hematopoiéticas exógenas

Alguns estudos apontam as células hematopoiéticas como protetoras em modelos de insuficiência renal aguda. Lin et al., mostraram a regeneração de células epiteliais tubulares pelo transplante de células-tronco hematopoiéticas em modelo de isquemia e reperfusão(30).

Apesar do estudo de Lin et al.(30), a infusão de células-tronco hematopoiéticas, excluídas as recém descobertas progenitoras endoteliais, não parecem demonstrar efeito benéfico tanto quanto as células-tronco mesenquimais. Após os trabalhos de Morigi et al.(31), os estudos que trabalham com infusão celular direta têm se voltado para as células mesenquimais. Esses autores mostraram, em modelo de insuficiência renal aguda por cisplatina, que a infusão de células mesenquimais protegeu os animais de lesão através de sua diferenciação nos túbulos lesados. O tratamento com células-tronco hematopoiéticas não ofereceu semelhante proteção.

Células-tronco Adultas Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais estão presentes no estroma da medula óssea e são responsáveis pela formação da matriz extra-celular (Figura 1). Estas células representam 0,01 a 0,0001% de todas as células da medula(23).

Elas podem ser identificadas pela característica de adesão em substrato plástico quando cultivadas in-vitro. Em cultivos as células mesenquimais geram osteócitos, condrócitos e adipócitos. Tem sido descrita também sua

diferenciação em outros tipos celulares não mesenquimais como tecido hepático, renal, cardíaco e células neurais(32).

Sua identificação pode ser feita pela expressão de marcadores de superfície como o CD90, CD73, CD105, CD44 e CD29 e também pela ausência dos marcadores hematopoiéticos como CD34 e CD45(24).

Infusão de células-tronco mesenquimais exógenas

Existem evidências de que as células-tronco mesenquimais também contribuam para o reparo da injúria em modelos de insuficiência renal aguda e como observado por Morigi et al.(31), sejam mais relevantes que a infusão da linhagem hematopoiética. Em modelo de IRA em ratos, por injeção de glicerol, a administração de células-tronco mesenquimais promoveu melhora da função renal. Nesse modelo de IRA ocorre extensa necrose tubular e pode-se observar migração das células-tronco para o rim lesado após 21 dias bem como sua diferenciação em células tubulares, promovendo a recuperação da injúria aguda(33).

Mais uma vez não se sabe o exato mecanismo de ação dessas células. Ele pode ocorrer através da diferenciação direta no tecido lesado ou por ação parácrina(34). Outro mecanismo envolvido seria uma possível ação

imunossupressora inibindo a maturação de células dendríticas e suprimindo a ação de células T, B e NK(35).

Os modelos com células-tronco mesenquimais envolvendo insuficiência renal crônica são escassos na literatura e os resultados parecem menos promissores que os modelos de insuficiência renal aguda. Choi et al., estudando o efeito de células-tronco mesenquimais em um modelo de doença renal crônica (nephrectomia 5/6) não demonstraram melhora na função renal dos ratos tratados com a infusão dessas células, porém observaram maior ganho de peso e menor proteinúria no grupo tratado(36).

Magnasco et al., utilizando o modelo de nefropatia por adriamicina em ratos também não observaram efeitos positivos no tratamento com células mesenquimais. Tanto na infusão concomitante quanto após a agressão as células-tronco mesenquimais não promoveram queda da proteinúria ou redução da progressão para insuficiência renal crônica. Os autores sugerem ausência de efeito benéfico das células mesenquimais nesse modelo(37).

Assim, os resultados dos trabalhos, que trataram a lesão renal com infusão direta de células-tronco adultas da medula (hematopoiéticas ou mesenquimais) obtiveram resultados de proteção nos modelos de insuficiência renal aguda, em especial para a linhagem mesenquimal(38). Os modelos de

insuficiência renal crônica, mesmo na infusão concomitante a agressão, não produziram resultados positivos até o momento(36;37).

Fatores de migração de células-tronco

Além do efeito direto da infusão dos vários tipos celulares envolvidos (células-tronco adultas mesenquimais, hematopoiéticas ou células-tronco embrionárias) podemos também beneficiar o tecido lesado com a produção de fatores de proliferação e migração (fatores de “homing”)(39).

Os fatores de proliferação e migração têm importante papel na recuperação do tecido lesado. Esses fatores são também chamados de fatores de tropismo ou na denominação em inglês conhecidos como “homing”. Acredita-se que seu mecanismo de ação deva-se ao estímulo de migração de células tronco-adultas da medula tanto hematopoiéticas quanto mesenquimais. Apesar de bem estabelecido que na infusão de células-tronco adultas exógenas a linhagem mesenquimal é superior a hematopoiética isto não é claro para as células-tronco produzidas pelo próprio organismo (endógenas). Para as células-tronco endógenas não se conhece o papel de cada uma dessas linhagens (hematopoiéticas e mesenquimais) no reparo ao tecido lesado(24) (Figura 2).

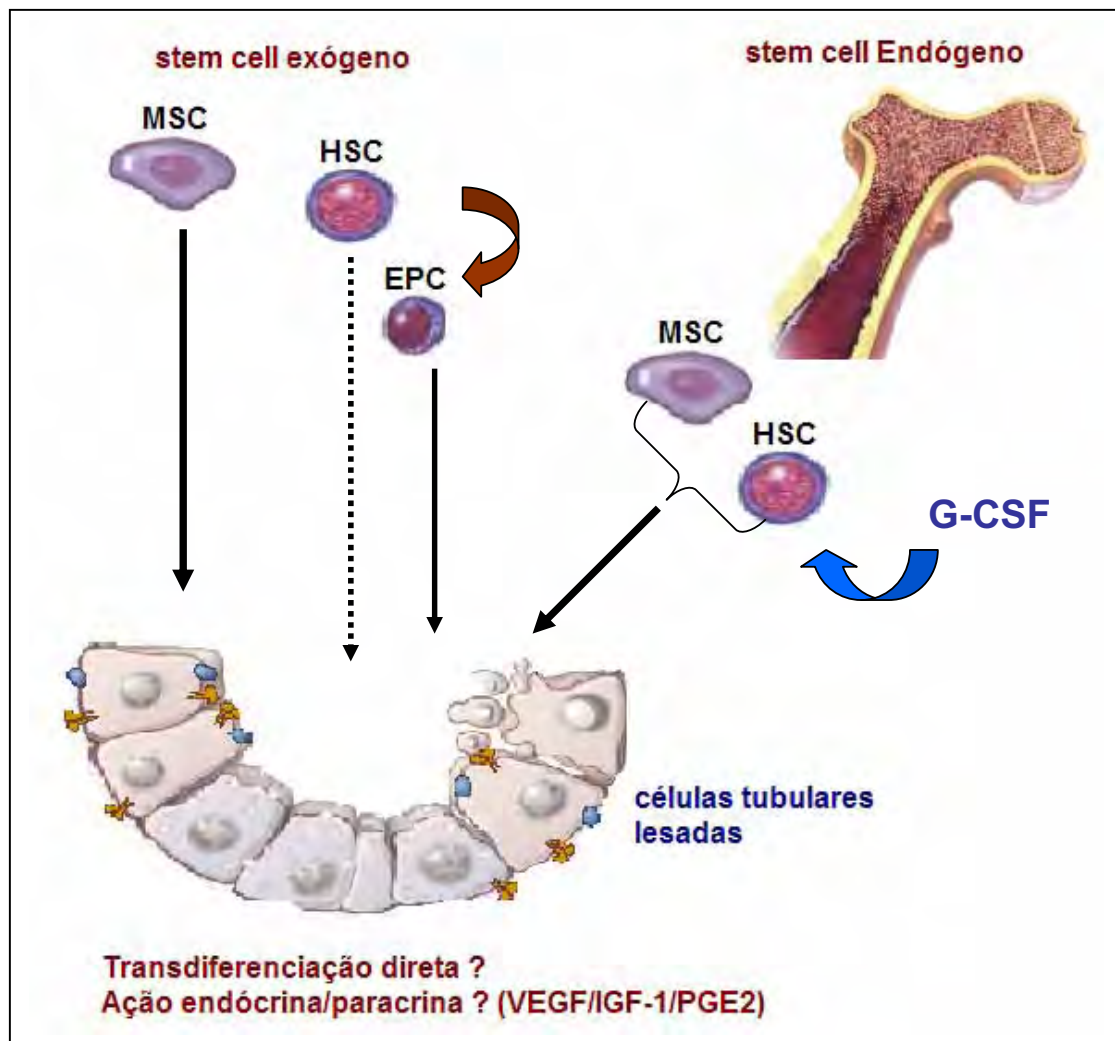


Figura 2. Papel das células-tronco endógenas, exógenas e do fator G-CSF (fator de "homing") na recuperação da lesão tubular aguda. As células-tronco mesenquimais (MSC) exógenas desempenham papel reconhecido na recuperação da lesão renal aguda (seta larga), as células-tronco adultas hematopoiéticas (HSC) exógenas exercem papel menos relevante (seta pontilhada). As células progenitoras endoteliais (EPC) derivam das células hematopoiéticas e podem contribuir para o reparo da lesão renal (seta contínua fina). Não se sabe a importância de cada linhagem (mesenquimais ou hematopoiéticas) das células-tronco endógenas na recuperação da injúria renal (seta larga a direita). O fator de tropismo G-CSF contribui para a mobilização da linhagem hematopoiética das células-tronco endógenas. Os mecanismos benéficos desses tipos celulares devem-se a transdiferenciação direta em células tubulares ou a atividade endócrina/parácrina como a produção de VEGF, IGF-1 ou PGE2.

Fatores de Migração de células-tronco: G-CSF

Dentre os fatores de “homing”, o fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF) tem reconhecido papel em mobilizar as células-tronco hematopoiéticas da medula e da circulação periférica(40). O fator G-CSF tem sido bastante estudado para tratamento das lesões cardíacas isquêmicas em eventos pós-infarto agudo do miocárdio ou em angina com resultados promissores(41;42). Existem evidências, em ratos, que o G-CSF promove a migração de células-tronco da medula para a área isquêmica do miocárdio com sua diferenciação em cardiomiócitos(43). No caso do rim, o uso de G-CSF para a prevenção da lesão mostra resultados conflitantes. Alguns estudos apontam para um benefício com o uso de G-CSF (44-46) e outros, entretanto, não encontraram semelhante resultado obtendo piora da lesão renal(47). O racional para o uso do G-CSF se faz devido sua propriedade de mobilização de células tronco-adultas para o tecido lesado com possível ação local de regeneração e/ou atividade parácrina. Porém, um possível efeito colateral é o aumento da inflamação (devido ao aumento de granulócitos) que a mobilização com esse fator pode causar.

Há evidências de que o fator G-CSF tem sua produção aumentada frente a estímulos isquêmicos. Zhang et al., demonstraram o aumento da expressão

de G-CSF na circulação e em túbulos renais em modelo de isquemia-reperfusão(48). Vários autores testaram então a aplicação exógena deste fator.

Assim, no estudo de Iwasaki et al., em modelo de lesão renal aguda pela cisplatina em camundongos BALB/c, a lesão renal foi atenuada com a infusão de G-CSF que mostrou menor valor de creatinina ao fim do estudo e maior sobrevida dos camundongos tratados. O mesmo resultado não foi observado com a infusão de M-CSF (estimulante de colônias de macrófagos), porém a infusão combinada (G-CSF e M-CSF) resultou na melhor sobrevida. No mesmo estudo, a administração de G-CSF após 1 mês da infusão de células tronco mesenquimais marcadas com fluoresceína, promoveu migração dessas células-tronco para os túbulos. Assim os autores concluíram que o G-CSF estimula a migração de células-tronco para o tecido lesado promovendo sua recuperação funcional(45).

Já no estudo de Nishida et al., com o mesmo modelo de lesão renal, a injúria foi atenuada com a infusão de G-CSF mostrando melhora da creatinina e redução do número de apoptose das células tubulares do grupo tratado. Nesse estudo a análise de células-tronco hematopoiéticas CD45⁺, c-Kit⁺ e CD34⁺ presentes no rim, ao fim do estudo, no grupo tratado não foram diferentes do controle sugerindo que outros mecanismos além da migração

direta de células-tronco ao tecido lesado podem estar envolvidos na proteção exercida pelo G-CSF(46).

Dentre os estudos negativos, Togel et al., em modelo de insuficiência renal aguda por isquemia-reperfusão mostraram que os animais tratados com G-CSF apresentaram piora da função renal. Já os animais tratados com G-CSF junto com ciclofosfamida tiveram evolução semelhante ao controle. A piora, do grupo G-CSF, foi atribuída ao efeito inflamatório de neutrófilos que migraram ao tecido sob a ação desse fator. Esse efeito não foi observado quando o número de leucócitos estava reduzido por efeito da ciclofosfamida no grupo G-CSF+ciclofosfamida. Assim a migração de leucócitos circulantes parece ser importante para a resposta à agressão do tecido renal e o G-CSF, ao estimular a granulocitose pode, em teoria, aumentar a inflamação com efeitos deletérios sobre a isquemia-reperfusão(47).

De modo diferente Stokman et al., em modelo de lesão renal aguda idêntico ao acima descrito (isquemia-repersufão) junto com transplante de medula e estímulo com G-CSF mostraram que o grupo estimulado com o fator teve evolução melhor do que o controle com redução dos níveis de uréia e creatinina. Apesar do G-CSF aumentar os granulócitos séricos no grupo tratado, eles estavam presentes em menor número no tecido renal em relação ao controle diferentemente do que mostraram Togel el al(47). Também nesse

estudo não foi possível encontrar um aumento no número de células-tronco no grupo G-CSF e assim o efeito benéfico do tratamento não pode ser explicado apenas pela mobilização de células-tronco e sua diferenciação nos tipos celulares lesados(49).

Em resumo, nos modelos de lesão renal aguda (cisplatina ou isquemia-reperfusão) o efeito do G-CSF parece benéfico com proteção da função renal. Já os estudos de G-CSF descritos com lesão renal crônica são escassos na literatura. Stokman et al., estudando um modelo de lesão renal crônica (obstrução ureteral unilateral) e estímulo de G-CSF junto com SCF (fator estimulante de células-tronco) observaram um aumento de células-tronco circulantes periféricas por citometria de fluxo, entretanto, sem melhora da fibrose, do dano renal e da resposta inflamatória no grupo tratado. Assim nesse modelo de lesão renal crônica a administração concomitante de G-CSF com SCF não preveniram a evolução da nefropatia no rim obstruído(50).

Dado o exposto, atualmente, o fator G-CSF é reconhecido além de suas funções sobre o sistema hematológico em pacientes neutropênicos e passa a ser utilizado como fator de migração para células-tronco adultas, em especial da linhagem hematopoiética. Como discutido acima sua ação sobre a função renal em modelos de insuficiência renal aguda é controverso, entretanto, na maioria dos estudos ele aparece com fator de melhor prognóstico(44-46). Já na

insuficiência renal crônica os modelos ainda são menos estudados e os resultados até o momento não são positivos para o G-CSF(50).

Quanto ao seu mecanismo de ação ainda não existe consenso. Não podemos atribuir suas ações apenas pelo tropismo de células-tronco para o rim lesado já que vários estudos mostraram melhora da função renal, mas foram incapazes de demonstrar a migração de células-tronco(46;49). Seu mecanismo de ação é complexo e não está bem definido sendo prováveis as seguintes ações: modulação da ação de neutrófilos, mobilização de células-tronco hematopoiéticas, estímulo da migração e proliferação de células endoteliais, efeito direto do G-CSF sobre as células tubulares e efeito de modulação sobre as células T(40).

Fatores de Migração de células-tronco: Outros Fatores

Outros fatores estimulantes de progenitores de células-tronco têm sido estudados com aplicações clínicas relevantes. Os mais estudados são: eritropoetina (EPO), fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF), o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o fator estimulante de células-tronco (SCF)(51). Como já mostrado o G-CSF

parece ser promissor em modelos de insuficiência renal aguda e ainda pouco estudado em modelos de insuficiência renal crônica.

Fatores de Migração de células-tronco e a Mobilização de células progenitoras endoteliais

A mobilização de células progenitoras endoteliais é um importante mecanismo de ação destes fatores de tropismo para células-tronco. Assim os fatores acima atuam principalmente sobre a linhagem hematopoiética promovendo sua transformação em progenitores endoteliais e estimulando a sua mobilização da medula óssea e também de outros locais tais como tecido muscular, adiposo e outros como o próprio tecido renal(25). A mobilização pode ser produzida pelos seguintes fatores: lesão tecidual, produção do fator induzido pela hipóxia (HF-1), produção de VEGF, eritropoetina, G-CSF e fator de crescimento derivado da placenta (PIGF)(25;26) (Figura 3). Nishida et al.(40), atribuíram o mecanismo de ação do G-CSF a diversos fatores nem sempre relacionados ao tropismo direto e migração para o tecido lesado. Entretanto, Powell et al., demonstraram que a administração de G-CSF promoveu a mobilização de células progenitoras endoteliais em pacientes com doença isquêmica do miocárdio(52). Assim, permanece a dúvida sobre o exato mecanismo de ação dos fatores de tropismo.

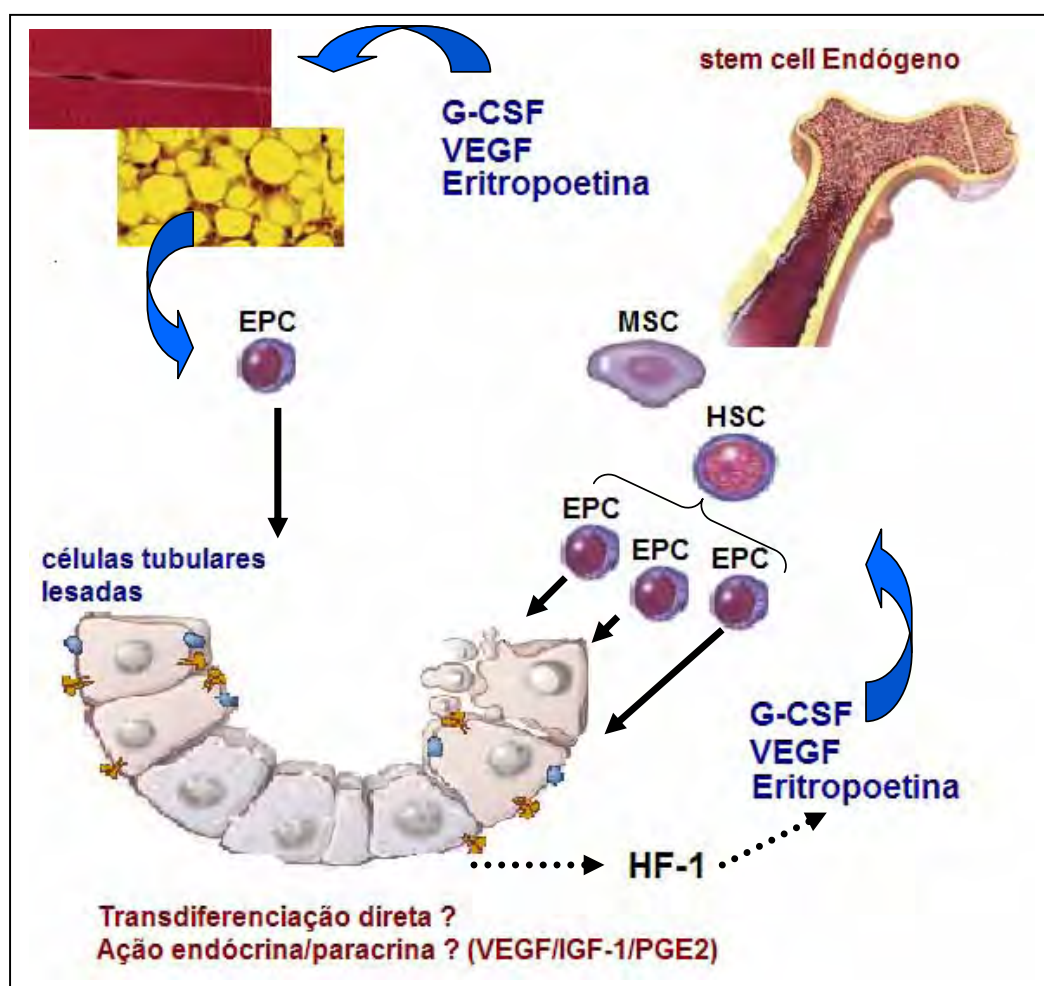


Figura 3. Provável mecanismo de ação dos fatores de tropismo para células-tronco hematopoiéticas na lesão renal aguda. Os fatores G-CSF, eritropoetina e VEGF estimulam a medula óssea a produzir células-tronco hematopoiéticas (HSC) endógenas que se diferenciam na linhagem progenitora endotelial (EPC). Em menor grau estes fatores estimulam as células-tronco mesenquimais (MSC). Os mesmos fatores também estimulam outros nichos extra-medula como tecido ósseo e adiposo a liberarem os progenitores endoteliais que atuam reparando o tecido renal lesado. As células tubulares, em resposta a hipóxia liberam o fator induzido pela hipóxia (HF-1) que contribui em estimular a produção de eritropoetina e VEGF.

Fatores de Migração de células-tronco: Eritropoetina

A eritropoetina é um hormônio bem conhecido por sua capacidade em estimular a formação e diferenciação de precursores eritróides da medula óssea. Ela é liberada na circulação pelas células intersticiais do rim (fibroblastos) em resposta a hipóxia e age através de ligação em receptores específicos (EPO-r) nos precursores eritroides. A produção de hemácias é assim estimulada através da inibição da apoptose de eritroblastos imaturos levando a sua diferenciação e maturação(53). Quando usada em altas doses (300UI/kg a 5.000UI/kg) pode prevenir a lesão renal aguda(54). O mecanismo de ação sugerido é a proteção das células tubulares renais através da inibição da apoptose celular pela inibição das caspases 3, 8 e 9 no túbulo proximal(55). Outro possível mecanismo de ação deve-se ao estímulo de recrutamento de progenitores endoteliais da medula(56) (Figura 3).

O papel da eritropoetina na lesão renal aguda por isquemia-reperfusão é bem estudado sendo reconhecidos os efeitos benéficos da EPO na recuperação da função renal pelos mecanismos de inibição da apoptose tubular(55;57-59).

Yang et al., usando modelo de IRA por isquemia-reperfusão mostraram que a administração de EPO na dose de 3000UI/kg em pré-condicionamento resultou em menor creatinina e menor número de células apoptóticas nos

túbulos no grupo tratado(59). Imamura et al., com o mesmo modelo, também observaram redução de células apoptóticas nos túbulos renais e sugerem a participação do HF-1 (fator induzido pela hipóxia)(57).

Em modelos de IRA por cisplatina a eritropoetina também aparece com ação protetora da função renal(60;61). Bagnis et al., estudando o efeito da eritropoetina na dose de 100UI/kg por 9 dias mostraram melhora da função renal no grupo tratado(60).

De maneira semelhante a eritropoetina também parece proteger outros órgãos de insultos tóxicos por mecanismos anti-apoptóticos. Estudos com cardiopatia induzida pela adriamicina mostram proteção nos grupos tratados com a EPO(62-65).

Estudos usando eritropoetina ou seus análogos em modelos de doença renal crônica ainda são escassos na literatura. Noiri et al., utilizando darbepoetina, um análogo da eritropoetina de ação prolongada, com modelo de adriamicina em ratos mostraram proteção da darbepoetina no grupo tratado tanto na função renal quanto na lesão cardíaca induzida pela adriamicina. O grupo tratado apresentou menores níveis de uréia, creatinina, menor massa de ventrículo esquerdo e menos alterações fibróticas(66). Em resumo, os estudos com EPO e insuficiência renal aguda mostram proteção da lesão tubular isquêmica nos diversos modelos experimentais(55;57-61). Para a insuficiência

renal crônica, apesar do menor número de estudos, o fator também apresenta resultados de proteção da nefropatia(66).

Modelos de Insuficiência Renal Crônica

Para a realização do presente trabalho utilizamos o modelo de doença renal crônica da nefropatia por adriamicina. Outros modelos descritos na literatura são: a obstrução ureteral unilateral e a nefrectomia 5/6.

O modelo de obstrução ureteral unilateral é descrito como um modelo de fibrose e doença renal progressiva de praticamente qualquer etiologia. A obstrução ureteral leva a alterações hemodinâmicas e metabólicas. Logo após a obstrução ocorre hidronefrose seguidas de lesão tubular com apoptose e necrose das células tubulares bem como infiltrado de macrófagos no interstício. A produção de TGF- β pelos macrófagos é responsável pela apoptose/necrose das células tubulares e pela transdiferenciação dos túbulos em fibroblastos. A proliferação de fibroblastos e miofibroblastos no interstício leva a um excesso de deposição de matriz extra-celular com conseqüente fibrose(67).

O modelo de nefrectomia 5/6 envolve a remoção de parte significativa do parênquima renal levando a hipertrofia compensatória seguida de hipertensão, proteinúria e redução da função renal. Essas alterações estão associadas a glomeruloesclerose segmentar e focal, glomeruloesclerose global e lesão túbulo-intersticial(68).

Ambos os modelos de doença renal têm sido bastante utilizados recentemente em estudos com animais para testes com progressão da nefropatia.

Modelos de Insuficiência Renal Crônica - Nefropatia Induzida pela Adriamicina

A adriamicina (doxorubicina) é um antibiótico isolado do fungo *Streptomyces peuceutius* e tem sido utilizado no tratamento de diferentes neoplasias humanas.

Em ratos, a inoculação de adriamicina induz a lesão renal caracterizada pelo desenvolvimento precoce de síndrome nefrótica que evolui tardiamente para a esclerose glomerular(69).

Estudos seqüenciais demonstraram que proteinúria significativa passa a ocorrer entre uma a duas semanas após a inoculação, com tendência a elevação progressiva. Nos glomérulos de ratos as alterações morfológicas são detectadas precocemente com 13 dias após inoculação tornando-se evidentes com 28 dias. Essas alterações são caracterizadas por retração, presença de numerosos vacúolos e inclusões eosinofílicas em células podocitárias(70).

Além das alterações glomerulares observa-se a presença de intensa nefrite túbulo intersticial e conseqüente atrofia e dilatação tubular com fibrose intersticial(71;72).

Assim, a infusão de doxorubicina representa um modelo de doença renal crônica proteinúrica semelhante à glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) em humanos sendo este modelo bem documentado em ratos(69;73). A administração de adriamicina em camundongos resulta em modelo semelhante de doença renal crônica num tempo mais curto. Após 1 semana o grupo tratado com adriamicina apresenta proteinúria significativa e hipoalbuminemia com extensão máxima da doença ao fim de 6 semanas e grande uniformidade da lesão entre os animais(74). Dessa forma, Wang et al.(74) padronizaram a lesão renal da adriamicina em camundongos BALB/c, mas observaram que camundongos C57BL/6J não desenvolvem nefropatia por adriamicina mesmo quando esta é aplicada em doses muito elevadas.

A vantagem do modelo da adriamicina sobre a nefrectomia 5/6 e a obstrução ureteral unilateral é sua fácil reprodutibilidade através de uma única infusão endovenosa e a ausência da necessidade de procedimento cirúrgico para a obtenção do modelo. No presente trabalho, foi o modelo de doença renal crônica escolhido.

Objetivos

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de dois fatores estimulantes de células-tronco (G-CSF e eritropoetina) no modelo de lesão renal crônica da adriamicina em camundongos.

Hipótese: Creditamos a ação benéfica desses agentes em estimular a migração de células-tronco endógenas contribuindo para o reparo ao tecido lesado.

Justificativa: Estudos com G-CSF e eritropoetina em modelos de insuficiência renal crônica são escassos na literatura bem como seus mecanismos fisiopatológicos justificando trabalhos adicionais de investigação.

Materiais e Métodos

Animais

Foram usados camundongos machos isogênicos BALB/c (peso médio de 28gramas) com 12 semanas de idade provenientes do Biotério da UNICAMP. Os animais foram acomodados em gaiolas apropriadas, mantidos em temperatura constante e ciclo de 12hs dia e 12hs noite, com acesso livre a água e alimentação. Antes do início do estudo os animais foram aclimatados no laboratório experimental nas condições descritas por um período de 15 dias.

Modelo de Lesão renal

O modelo de lesão renal foi realizado pela administração endovenosa de 11mg/Kg de adriamicina (cloridrato de doxorubicina, Eurofarma) em infusão única na diluição de 2mg/ml pela veia caudal de cada animal. Esse modelo é análogo a glomeruloesclerose segmentar e focal em humanos e representa bem a doença renal proteinúrica como descrito anteriormente por Wang et al.(74).

No trabalho desse autor após 1 semana da infusão em veia caudal de dose única de adriamicina todos os animais desenvolveram proteinúria com perda de peso, queda de albumina e redução do clearance de creatinina e permaneceram vivos por 8 semanas(74).

Delineamento Experimental

Em todos os camundongos foi administrada adriamicina 11mg/Kg na veia caudal em infusão única. Após a infusão os animais foram divididos em grupos de pesos semelhantes: Grupo controle: adriamicina (n=10) e os grupos de tratamento: granuloquine (G) (n=10), eritropoetina (EPO) (n=10) e granuloquine associado à eritropoetina (G+EPO) (n=10) (Figura 4).

Os grupos de tratamento receberam injeções subcutâneas abdominais diárias no primeiro dia (concomitante a infusão de adriamicina) e nos dias 2 a 5 totalizando cinco dias de tratamento. O grupo controle recebeu injeções subcutâneas de salina em igual volume e periodicidade aos grupos de tratamento (primeiro dia e dias 2 a 5). O grupo do granuloquine recebeu a infusão de fator estimulante de colônias granulocíticas recombinante humano (metionil recombinante humano não-glicosilado (filgrastim, G-CSF), Granulokine® da Roche) na dose de 250µg/kg subcutâneo por cinco dias

consecutivos tendo início no mesmo dia da infusão da adriamicina. A dose de G-CSF foi semelhante aos trabalhos de Iwasaki et al., que utilizaram o fator para proteção de IRA em camundongos BALB/c(45). O grupo de EPO recebeu a eritropoetina humana recombinante (alfaepoetina® FioCruz) na dose de 4.000UI/Kg subcutâneo no primeiro dia e 1.000UI/kg quatro dias seguintes. A dose de EPO de 1.000UI/kg foi demonstrada por Heeschen et al., como efetiva para a mobilização de células progenitoras endoteliais em camundongos(56). O grupo G+EPO recebeu os dois tratamentos nas mesmas dosagens pelo mesmo período. Administração no primeiro dia de 250µg/kg de G-CSF e 4.000UI/Kg de EPO e nos quatro dias seguintes 250µg/kg de G-CSF e 1.000UI/Kg de EPO. (Figura 4).

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu.

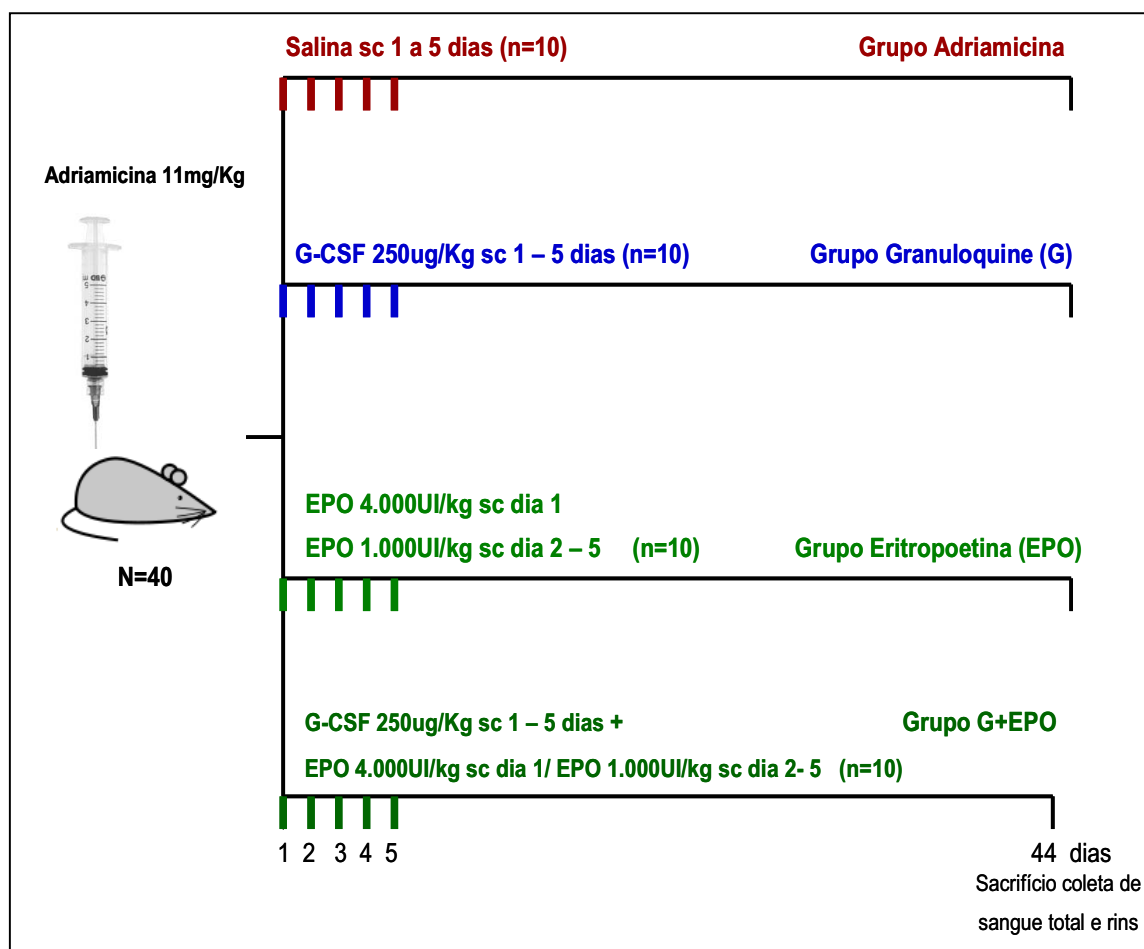


Figura 4. Delineamento nos diversos grupos de estudo. Inicialmente foi feita infusão de adriamicina 11mg/kg em 40 camundongos BALB/c na veia caudal em injeção única. Posteriormente feita divisão em 4 grupos e iniciado tratamento ou infusão de salina no mesmo dia da aplicação de adriamicina (dia 1). O grupo adriamicina (n=10) recebeu injeções de salina subcutâneo nos dias de 1 a 5 (controle doente não tratado). O grupo granuloquine recebeu G-CSF na dose de 250µg/kg subcutâneo nos dias 1 a 5. O grupo eritropoetina recebeu EPO na dose de 4.000UI/kg subcutâneo no dia 1 e após 1.000UI subcutâneo dos dias 2 a 5. O grupo G+EPO recebeu o fator G-CSF na dose de 250µg/kg nos dias 1 a 5 e conjuntamente EPO 4.000UI/kg no dia 1 e 1000UI/kg nos dias 2 a 5.

Os pesos dos animais foram medidos no momento inicial do estudo e no sacrifício nos diferentes grupos. Nesse período os animais permanecerem com acesso livre a água e alimentação e aclimatados em ciclos de 12hs dia e 12hs noite mantidos em temperatura constante.

Após o período de 6 semanas foi feito o sacrifício através de punção cardíaca sob anestesia (Ketamina 10mg/kg + xylazina 8mg/kg por injeção intramuscular) e coletado sangue total para análises bioquímicas. Os rins foram então pesados conjuntamente (direito e esquerdo) e após colocados no fixador apropriado (Boin), arquivados em bloco de parafina e cortadas com 3µm de espessura para as análises histológicas e de imunohistoquímica.

Análises Bioquímicas

Foram feitas análises bioquímicas para creatinina pelo método colorimétrico do ácido pícrico (Jaffé). A albumina foi realizada pela técnica do Verde de Bromocresol.

Avaliação Morfológica

Os tecidos incluídos em parafina foram cortados com 3µm de espessura e feitas colorações para Hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Masson pelos métodos habituais.

A severidade da lesão renal foi avaliada, sem conhecimento dos grupos, nas duas colorações realizadas (HE e tricrômico de Masson) de forma semiquantitativa em campos de pequeno aumento (200x) e de grande aumento (400x) em toda extensão da amostra (rim total em corte transversal). Os parâmetros analisados foram: número de áreas de atrofia, fibrose intersticial e percentagem de esclerose glomerular. O número de áreas de atrofia foi realizado pela contagem, em toda a extensão da amostra, das áreas de esclerose glomerular somada a atrofia e dilatação tubular, fibrose intersticial e

infiltrado inflamatório linfomononuclear. A fibrose intersticial foi quantificada em intensidade de 0 a 3+ sendo zero ausência de fibrose e 3+ a maior fibrose nos grupos de amostra. A percentagem de esclerose glomerular foi realizada contando-se numa amostra de aproximadamente 1/3 do tamanho do fragmento contendo no mínimo 50 glomérulos a percentagem de esclerose segmentar ou global.

Análise de Imunohistoquímica

A análise de imunohistoquímica teve como base demonstrar a presença de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais no tecido renal dos animais em estudo. Foram utilizados os marcadores CD34, Sca1 e CD105 anti-camundongo nos fragmentos renais. Para a revelação foi utilizado o anticorpo secundário HRP.

O anticorpo CD34 rato anti-camundongo reage com o CD34 que é uma proteína expressa nas células endoteliais e em progenitores hematopoiéticos. O CD34 é uma molécula de adesão com uma possível ação inicial na hematopoiese mediando a ligação das células-tronco a matriz extracelular da medula óssea. Seus ensaios são usados para medir angiogênese e também para avaliar a expressão de células-tronco hematopoiéticas(75;76). Sua expressão é

vista nas células dos capilares peritubulares. Foi utilizado o produto da Abcam® Rat monoclonal [MEC 14.7] to CD34 – Hematopoietic Stem Cell Marker na diluição de 1/150.

O anticorpo Sca1/Ly6A/E rato anti-camundongo reage com um antígeno expresso em células-tronco hematopoiéticas. O Sca1 também é conhecido como Ly6A/E sendo um membro da família do glicofosfatidilinositol uma proteína de ancoragem da superfície celular. Ela é expressa nas células-tronco hematopoiética multipotentes do camundongo nas formas Ly6.1 e Ly6.2(77;78). O Sca1 é expresso no rim nas células tubulares e capilares glomerulares(78). Foi utilizado produto da Abcam® rat monoclonal [E13 161-7] to Sca1/Ly6A/E na diluição de 1/2000.

O anticorpo CD105 rato anti-camundongo reage com o CD105 do camundongo. O CD105 é também conhecido como endogлина sendo uma glicoproteína de membrana que faz parte da via do receptor de sinalização do TGF- β . Esta proteína é expressa em células endoteliais vasculares humanas e células-tronco mesenquimais(79-81). A expressão de CD105 é vista nas células mesangiais dos glomérulos, células intersticiais e em endoteliais vasculares(79). Foi utilizado produto da Abcam® rat monoclonal [RM0030-6J9] to CD105 na diluição de 1/300.

Os tecidos foram incluídos em parafina, cortados com 3µm de espessura, colocados em lâminas de vidro previamente tratadas com poly-d-lysine. As lâminas foram riscadas com diamante, cercando os cortes para a contenção dos reagentes sobre o tecido e deixadas em estufa a 56°C por uma noite. Em seguida foram desparafinadas em 3 cubas com xilol por 5 minutos e hidratadas em 4 cubas com álcool etílico absoluto e lavadas em água. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada a 3%.

Para recuperação dos epítomos foi utilizado o método de citrato de sódio 0,21% pH 6.0 em câmara de pressão (Pascal Dako) para CD34, Sca1 e CD105.

As lâminas foram então transferidas para bandejas especiais de imuno-histoquímica, recebendo o anticorpo primário CD34, Sca1 e CD105 respectivamente nas diluições: 1/150; 1/2000; 1/300 ficando assim incubadas em sistema overnight.

Depois da retirada do anticorpo primário por meio de lavagem com PBS (solução salina tamponada) foram feitas sensibilização antigênica e incubação com o anticorpo anti-rato HRP da Abcam® Rabbit polyclonal to Rat IgG – H&L(HRP). Os tecidos assim receberam os reagentes secundários (biotinilado universal) por 30 minutos e logo após o reagente terciário (streptavidina)

também por 30 minutos. A revelação foi realizada com cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina - Dako®) por 5 minutos. A contra coloração foi realizado com hematoxilina de Harris.

Para a interpretação dos resultados, foi utilizado analisador de imagem Leica® (ver 3.5.0/2009) e câmera Leica ICC50 acoplada. As medidas foram feitas por um único observador sem conhecimento prévio dos grupos. Para cada lâmina foi feita a leitura de dez campos consecutivos em aumento 400x. A quantificação foi realizada utilizando a ferramenta de cálculo de área de forma manual circundando as regiões coradas pelos reagentes de imunohistoquímica. Para os reagentes CD34 e CD105 foram consideradas as regiões intersticiais sem considerar os grandes vasos e os glomérulos. Para o reagente Sca1 foram considerados o interstício e os túbulos corados pelo marcador sendo desconsiderados os glomérulos. Cada unidade de amostra foi representada pelo somatório da área total nos dez campos em aumento 400x e expressos em μm^2 .

O controle positivo foi realizado com medula óssea e baço e o controle negativo em rim. O controle positivo atestou a presença de células-tronco de linhagens hematopoiéticas (CD34^+ e Sca1^+) e linhagens mesenquimais (CD105^+) na medula óssea de camundongo BALB/c. O controle negativo mostrou a baixa expressão destas linhagens no rim do camundongo BALB/c.

Estes controles foram realizados em camundongos não pertencentes a nenhum dos grupos de estudo e sem a infusão de adriamicina.

Análise Estatística

Inicialmente foi feito teste da normalidade para separar as variáveis contínuas em paramétricas e não paramétricas. Para o teste da normalidade foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov (KS). A análise das médias das variáveis com distribuição normal nos quatro grupos em estudo foi feita através da análise de variância (ANOVA de uma via). Foram assumidas variâncias iguais entre os grupos. A análise da homogeneidade das variâncias foi feita pelo teste de homogeneidade de Levene. Para a sub-análise dos grupos utilizamos o pos-teste de Bonferroni. Essas variáveis foram expressas em média e desvio padrão e nas tabelas foram acrescentados os valores mínimos e máximos. Para as variáveis não paramétricas foi usada a análise de variância de Kruskal-Wallis. Para a comparação entre subgrupos utilizamos o pós-teste de Dunn's. As variáveis obtidas dessa forma foram expressas em mediana e percentil 25 e 75. As análises de correlações foram feitas através do teste de Pearson e considerados todos os casos em estudo sem divisões por grupos. Para a análise de mortalidade nos grupos foi utilizado o teste exato de Fisher. Significância estatística foi considerada para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico SPSS® versão 13.0.

Resultados

Os pesos iniciais dos animais foram semelhantes entre os grupos: $27,60 \pm 0,7\text{g}$ no grupo adriamicina (controle); $27,30 \pm 1,06\text{g}$ no granuloquine; $27,41 \pm 1,25\text{g}$ no EPO e $28 \pm 1,16\text{g}$ no G+EPO (Tabela 1). A mortalidade foi de 50% (n=5) no grupo adriamicina; 30% (n=3) no grupo granuloquine e 40% (n=4) nos grupos EPO e G+EPO. Não houve diferenças estatísticas na mortalidade entre os grupos.

Tabela 1. Peso médio inicial (gramas) dos animais nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

	N	Peso Médio(g)	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Adriamicina	5	27,60	0,70	27,80	28,10
Granuloquine	7	27,30	1,06	27,30	28,00
EPO	6	27,41	1,25	26,90	28,00
G+EPO	6	28,16	1,16	27,00	27,90
Total	24	27,10	0,33	26,90	28,10

O peso final dos animais após 6 semanas do estudo foi o seguinte nos grupos: $23,12 \pm 1,87\text{g}$ no grupo adriamicina (controle); $23,9 \pm 4,57\text{g}$ no granuloquine; $26,63 \pm 3,47\text{g}$ no EPO e $21,98 \pm 3,58\text{g}$ no G+EPO. Não houve diferenças estatísticas de peso entre os grupos. (Tabela 2).

Tabela 2. Peso médio final em gramas dos animais nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

	N	Peso Médio(g)	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Adriamicina	5	23,12	1,87	20,50	24,70
Granuloquine	7	25,03	3,43	20,3	30,7
EPO	6	25,15	1,92	21,60	26,7
G+EPO	6	24,12	1,25	22,4	26,00
Total	24	24,43	2,34	20,3	30,70

Os animais perderam peso de forma significativa ao fim do estudo em todos os grupos em relação ao peso inicial ($p=0,001$), porém não houve diferenças ao final do seguimento entre os grupos (Figura 5).

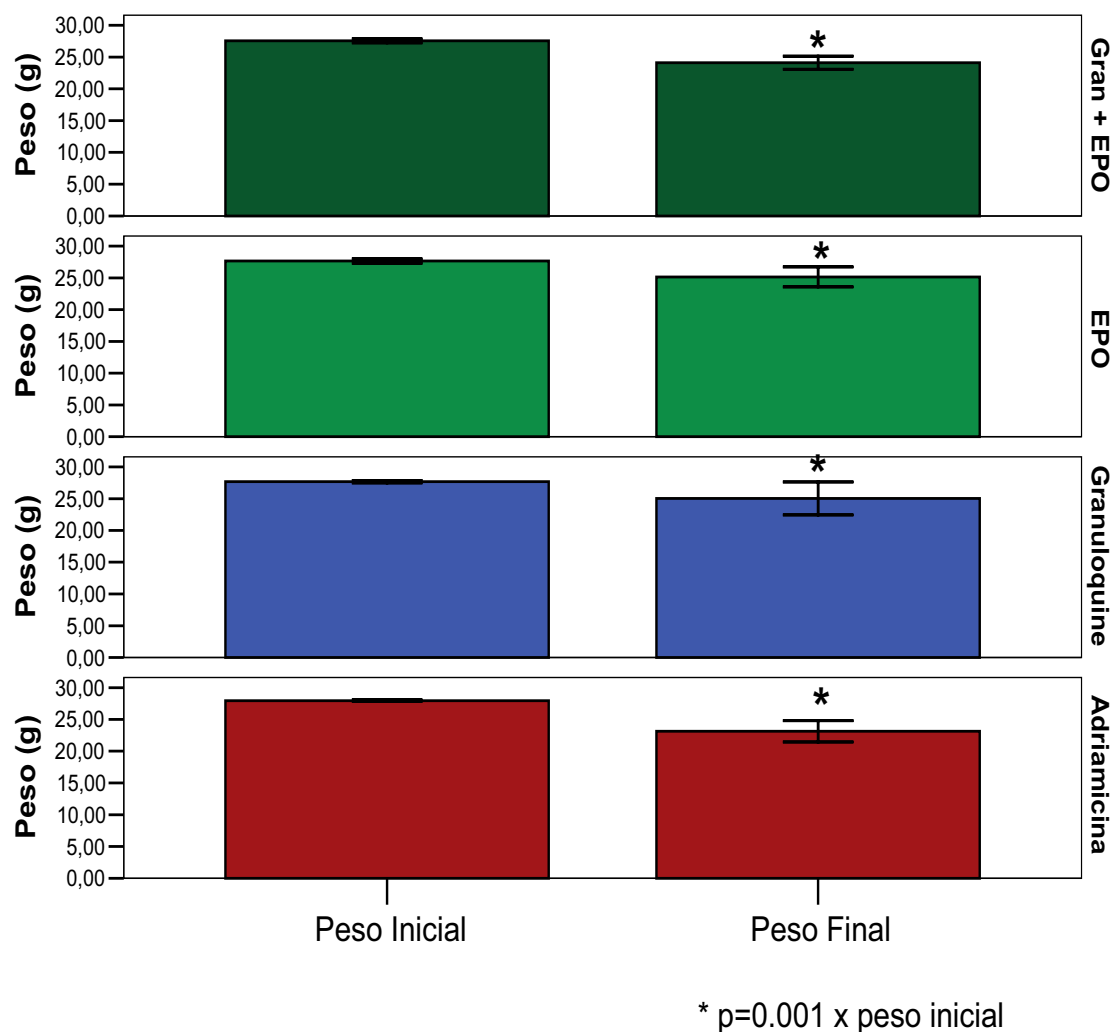


Figura 5. Peso médio inicial e final dos animais nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). * p=0,001 x peso inicial

O peso ao final do estudo de ambos os rins foi o seguinte nos grupos: 0,35±0,28g no adriamicina (controle); 0,33±0,57g no granuloquine; 0,37±0,05g no EPO e 0,33±0,04g no G+EPO. Não houve diferenças entre os grupos. (Tabela 3, Figura 6).

Tabela 3. Peso médio renal ao fim do estudo em gramas dos animais nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

	N	Peso Médio(g)	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Adriamicina	5	0,35	0,03	0,26	0,33
Granuloquine	7	0,33	0,06	0,26	0,40
EPO	6	0,37	0,05	0,28	0,44
G+EPO	6	0,33	0,04	0,27	0,37
Total	24	0,34	0,05	0,26	0,44

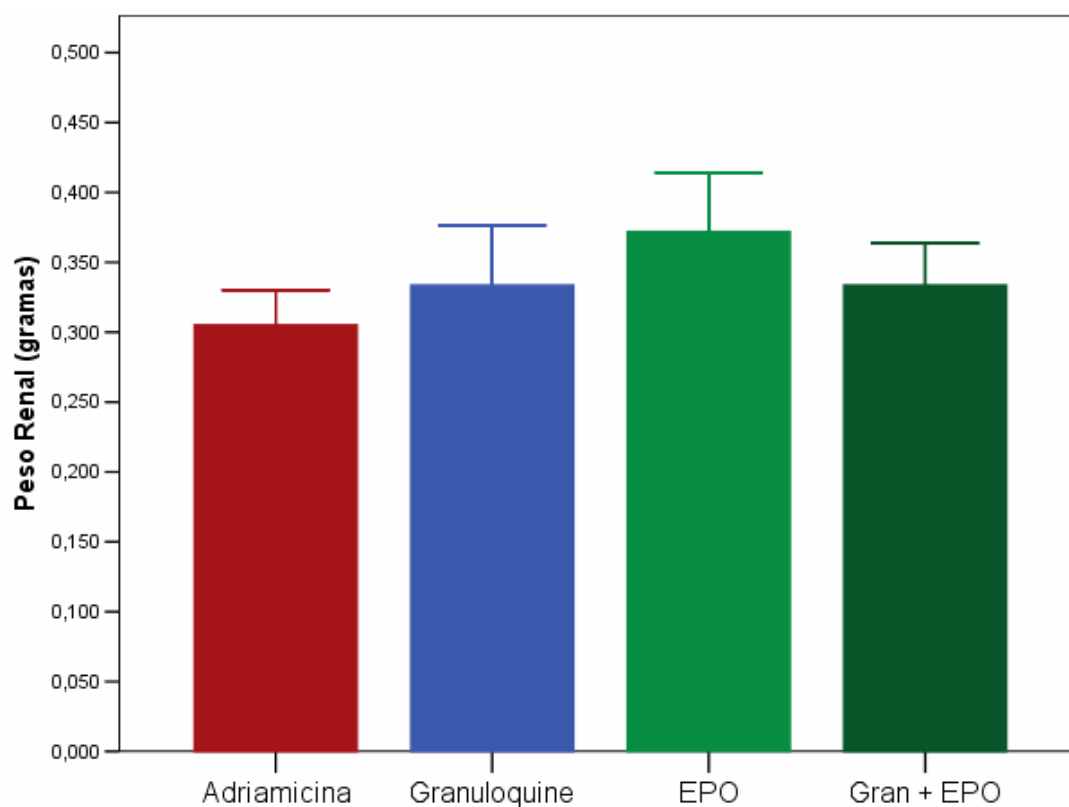


Figura 6. Peso médio renal ao fim do estudo em gramas nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

Análises Bioquímicas

A análise da função renal pela medida da creatinina ao fim do estudo mostrou a seguinte distribuição nos grupos: 0,36[0,34-0,40]mg/dl no grupo adriamicina (controle); 0,38[0,34-0,40]mg/dL no grupo granuloquine; 0,35[0,33-0,35]mg/dL no EPO e 0,33[0,32-0,34]mg/dL no G+EPO. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Tabela 4 e Figura 7).

Tabela 4. Creatinina ao fim do estudo (mg/dL) nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

	N	Creatinina (mg/dL) Mediana	Percentil 25%	Percentil 75%
Adriamicina	5	0,36	0,34	0,40
Granuloquine	7	0,38	0,34	0,40
EPO	6	0,35	0,33	0,35
G+EPO	6	0,33	0,32	0,34
Total	24	0,35	0,33	0,38

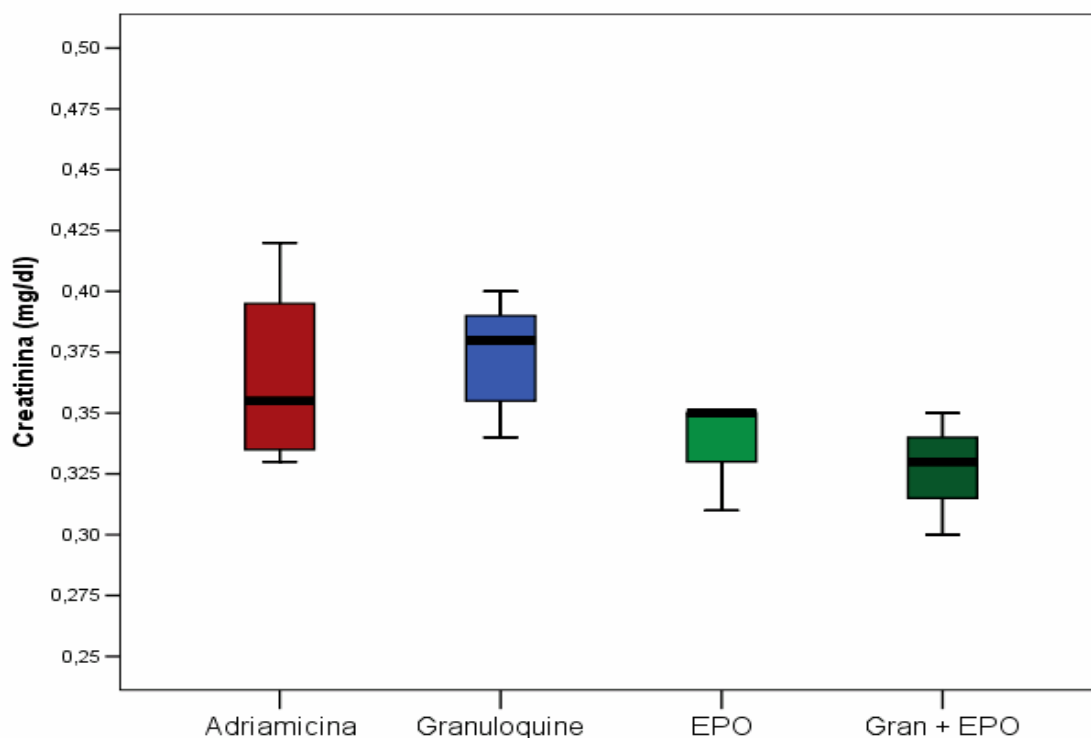


Figura 7. Creatinina ao fim do estudo (mg/dL) nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

A albumina ao fim do estudo nos grupos teve o seguinte resultado: 1,55[1,50-1,90]g/dL no grupo adriamicina (controle); 1,70[1,40-1,80]g/dL no granuloquine; 1,50±[1,40-1,70]g/dL no grupo EPO e 1,70[1,60-1,90]g/dL no G+EPO. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Tabela 5 e Figura 8).

Tabela 5. Albumina ao fim do estudo (g/dL) nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

	N	Albumina (g/dL) Mediana	Percentil 25%	Percentil 75%
Adriamicina	5	1,55	1,50	1,90
Granuloquine	7	1,70	1,40	1,80
EPO	6	1,50	1,40	1,70
G+EPO	6	1,70	1,60	1,90
Total	24	1,65	1,50	1,80

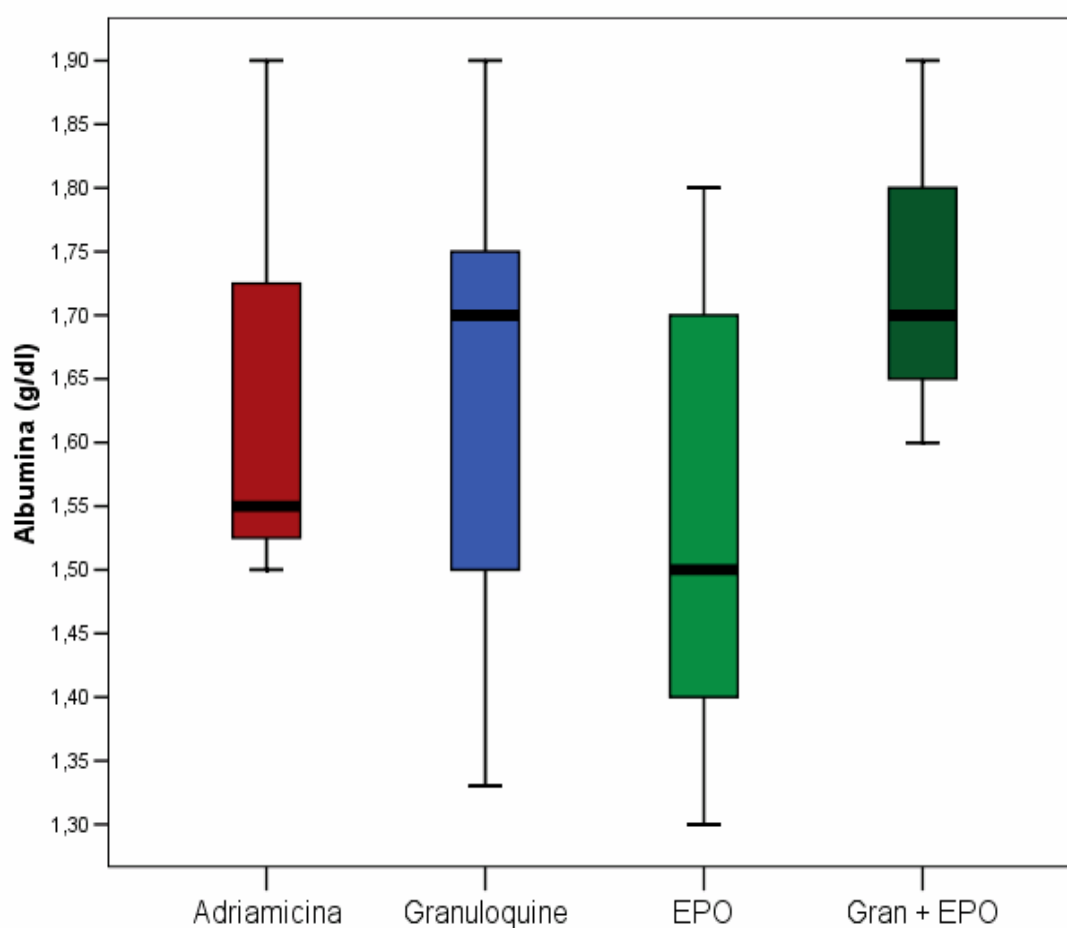


Figura 8. Albumina média ao fim do estudo (g/dL) nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

Análises Histológicas

A análise do número de áreas de atrofia (soma das áreas de esclerose glomerular, atrofia tubular, fibrose intersticial e infiltrado inflamatório) mostrou os seguintes resultados: $21,8 \pm 1,48$ no grupo adriamicina (controle); $13 \pm 4,4$ no grupo granuloquine; $11,83 \pm 4,36$ no grupo EPO e $13,5 \pm 2,51$ no grupo G+EPO. Os três grupos de tratamento (granuloquine, EPO e G+EPO) foram diferentes em relação ao controle ($p < 0,001$), não diferenciando entre si (Tabela 6, Figura 9).

Tabela 6. Número de áreas de atrofia nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

	N	Número médio	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Adriamicina	5	21,80	1,48	20,00	24,00
Granuloquine	7	13,00*	4,40	5,00	18,00
EPO	6	11,83*	4,36	5,00	17,00
G+EPO	6	13,50*	2,51	10,00	16,00
Total	24	14,67	5,03	5,00	24,00

* $p < 0,001$ x adriamicina.

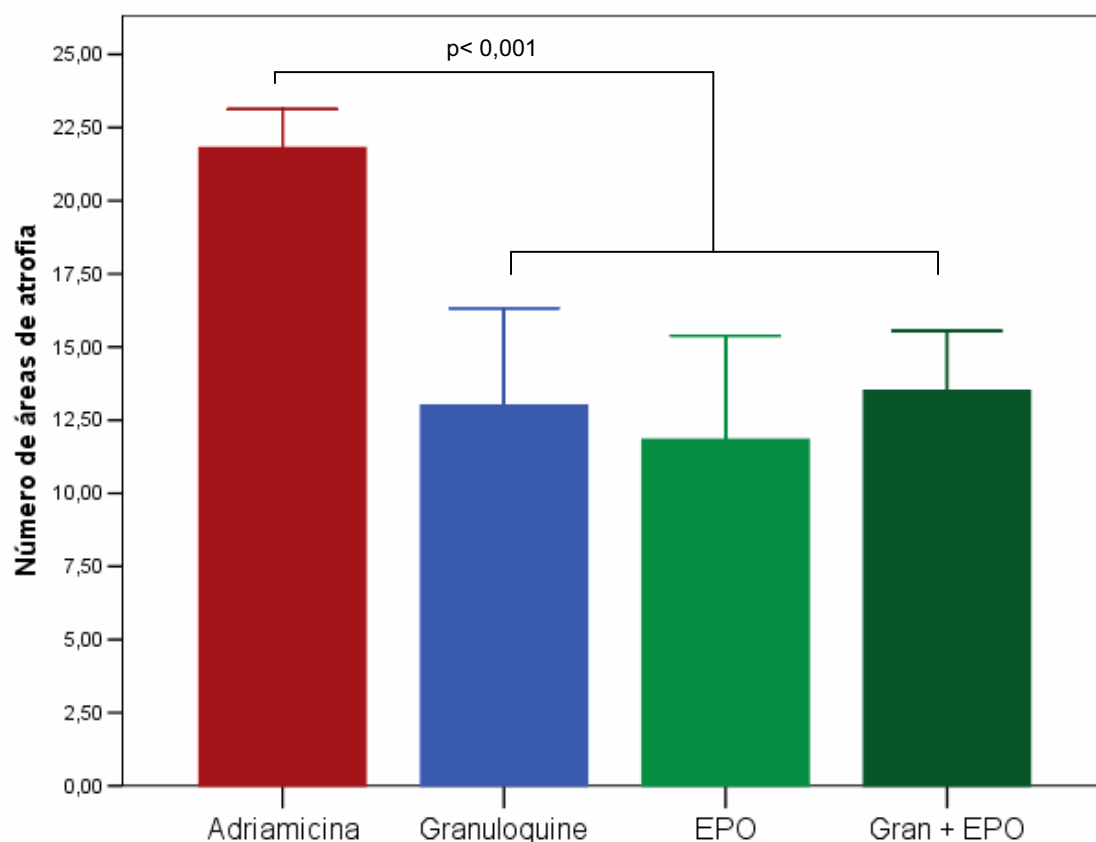


Figura 9. Número de áreas de atrofia nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). $p < 0,001$ nos grupos granuloquine, EPO e G+EPO x adriamicina.

A análise da percentagem de glomérulos esclerosados mostrou os seguintes resultados: $20,6 \pm 2,97\%$ no grupo adriamicina (controle); $9,14 \pm 5,27\%$ no grupo granuloquine; $8,5 \pm 4,89\%$ no grupo EPO e $12 \pm 2,76\%$ no grupo G+EPO. Os três grupos de tratamento (granuloquine, EPO e G+EPO) foram diferentes em relação ao controle ($p < 0,001$), não diferenciando entre si (Tabela 7, Figura 10).

Tabela 7. Percentagem de esclerose glomerular nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

	N	% Esclerose glomerular	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Adriamicina	5	20,60	2,97	18,00	25,00
Granuloquine	7	9,14*	5,27	2,00	16,00
EPO	6	8,50*	4,89	2,00	15,00
G+EPO	6	12,00*	2,76	8,00	15,00
Total	24	12,08	6,11	2,00	25,00

* $p < 0,001$ x adriamicina.

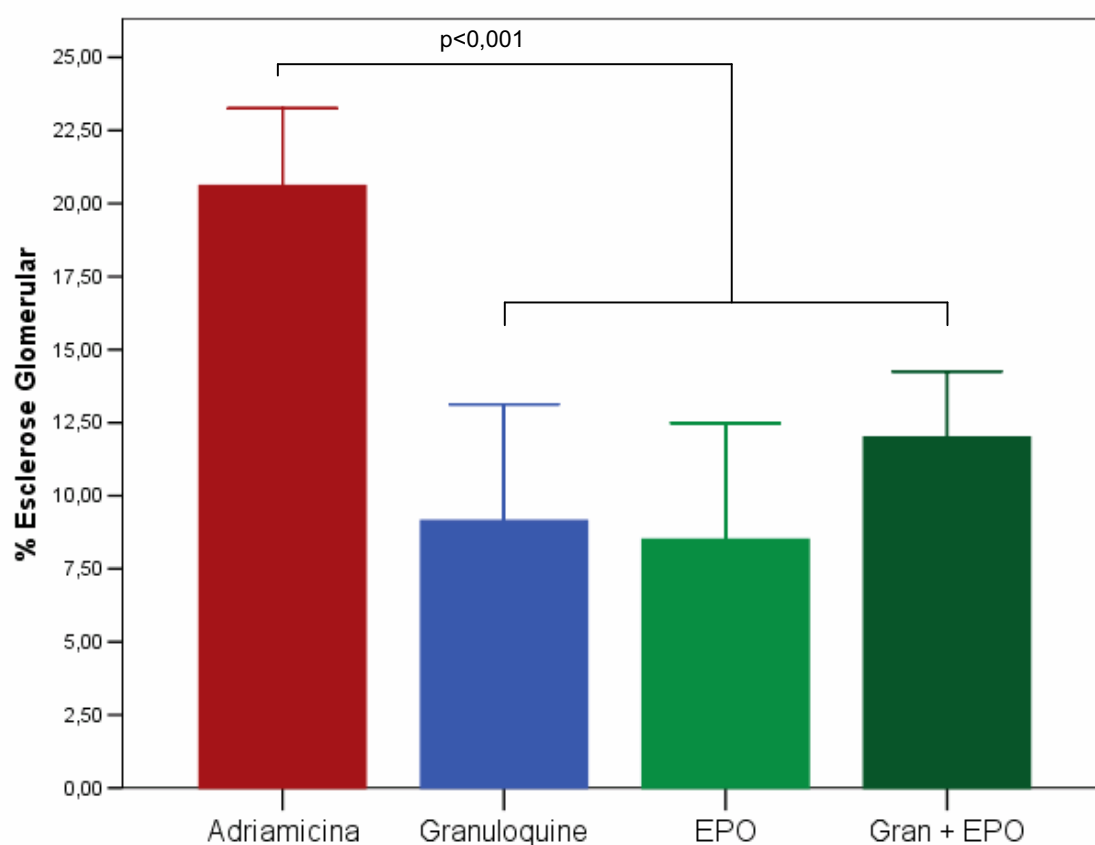


Figura 10. Percentagem de esclerose glomerular nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). $p < 0,001$ nos grupos granuloquine, EPO e G+EPO x adriamicina.

A análise da fibrose intersticial quantificada em intensidade de 1 a 3 mostrou os seguintes resultados: 3[3-3]+ no grupo adriamicina (controle); 2[1-2]+ no grupo granuloquine; 2[1-2]+ no grupo EPO e 2[1-2]+ no grupo G+EPO. Os três grupos de tratamento (granuloquine, EPO e G+EPO) foram diferentes em relação ao controle ($p < 0,019$), mas não diferiram entre si (Tabela 8, Figura 11).

Tabela 8. Intensidade da Fibrose Intersticial nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

	N	Fibrose Intersticial Mediana	Percentil 25%	Percentil 75%
Adriamicina	5	3	3	3
Granuloquine	7	2*	1	2
EPO	6	2*	1	2
G+EPO	6	2*	1	2
Total	24	2	1,5	3

* $p = 0,019$ x adriamicina.

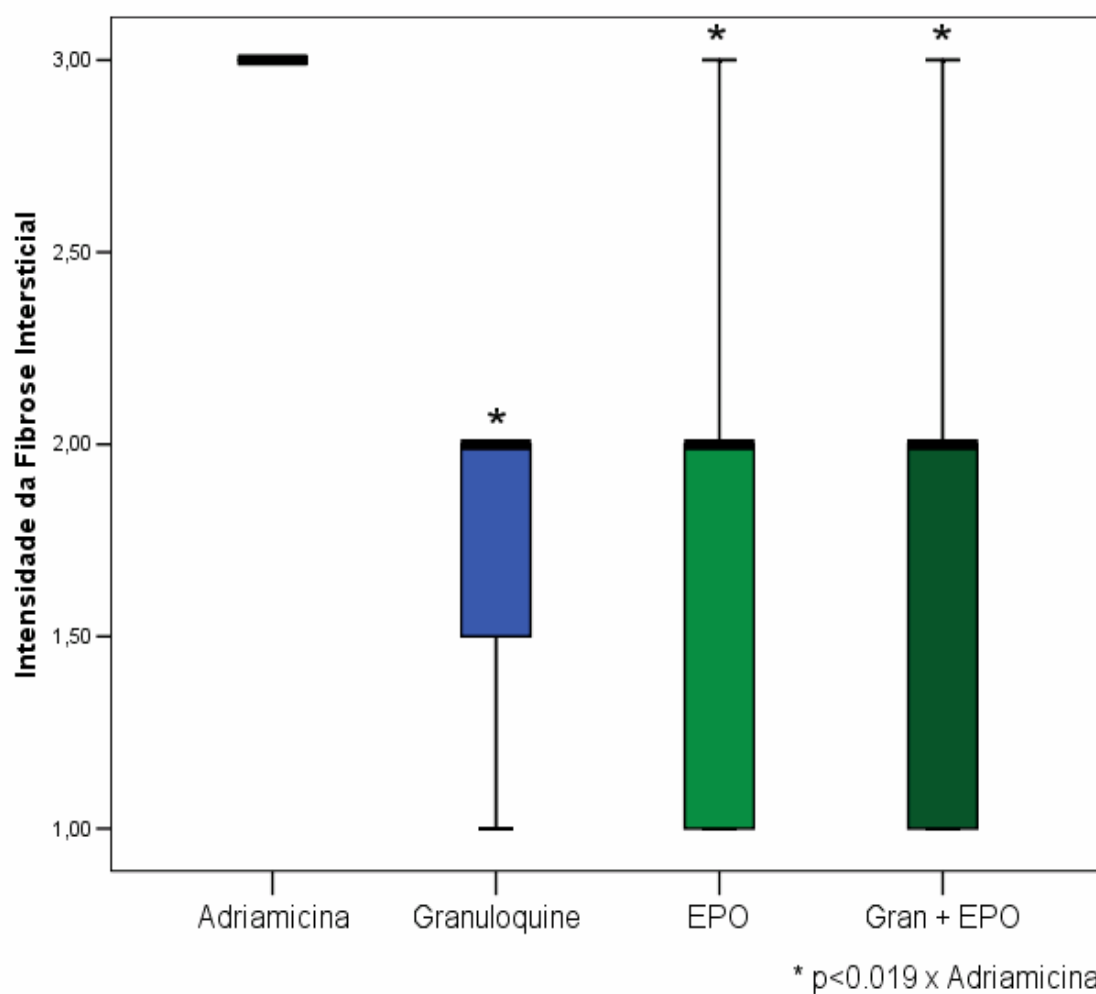


Figura 11. Intensidade da Fibrose Intersticial nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

* p=0,019 nos grupos granuloquine, EPO e G+EPO x adriamicina.

O grupo controle (adriamicina sem tratamento) apresentou os piores escores de lesões histológicas (número de áreas de atrofia, percentagem de esclerose glomerular e intensidade de fibrose) (Figura 12). Os demais grupos do estudo apresentaram escore de lesão semelhante entre si, porém significativamente diferentes do controle (Figura 13). As fotografias, em cada grupo, representam animais com lesão histológica igual a mediana.

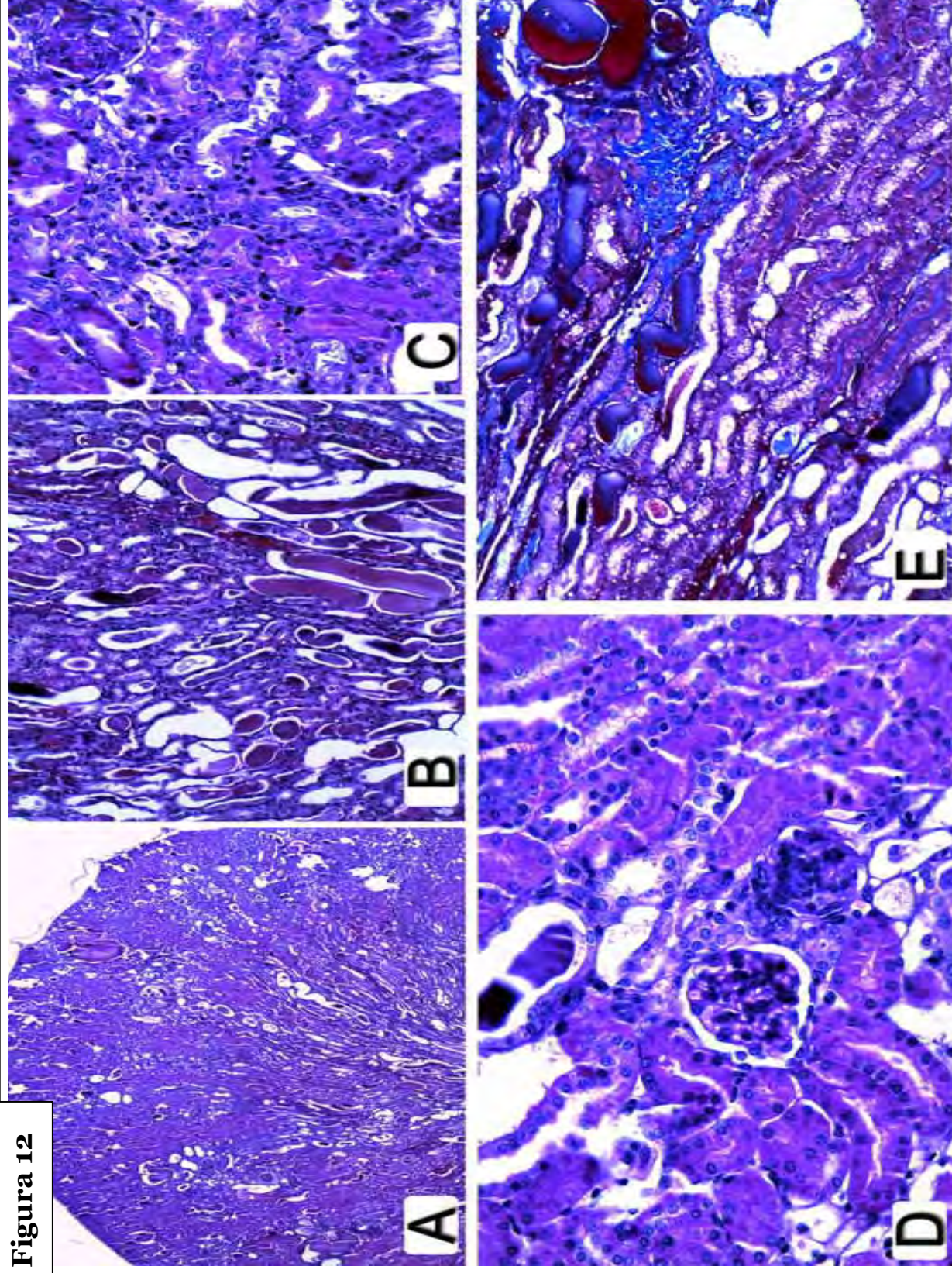
Figura 12

Figura 12. Aspecto histológico dos rins ao fim do estudo no grupo controle (adriamicina sem tratamento). As fotografias são de animais que apresentaram lesão histológica igual a mediana do grupo. A) Aspecto global (número de áreas de atrofia). Notar a intensa atrofia, dilatação tubular e fibrose intersticial que se repetem em faixas entremeadas com áreas sem lesão (HE x 40). B) Detalhe da atrofia e dilatação tubular característico da nefropatia pela adriamicina. Presença de grande número de cilindros intratubulares (HE x 200). C) Infiltrado inflamatório linfomononuclear entre os túbulos (HE x 400). D) Detalhe mostrando dois glomerulos sendo um com esclerose parcial (HE x 400) E) Coloração de Masson visando quantificar a intensidade da fibrose. Áreas de fibrose intensa (em azul) entremeadas por áreas sem fibrose (Masson x 200).

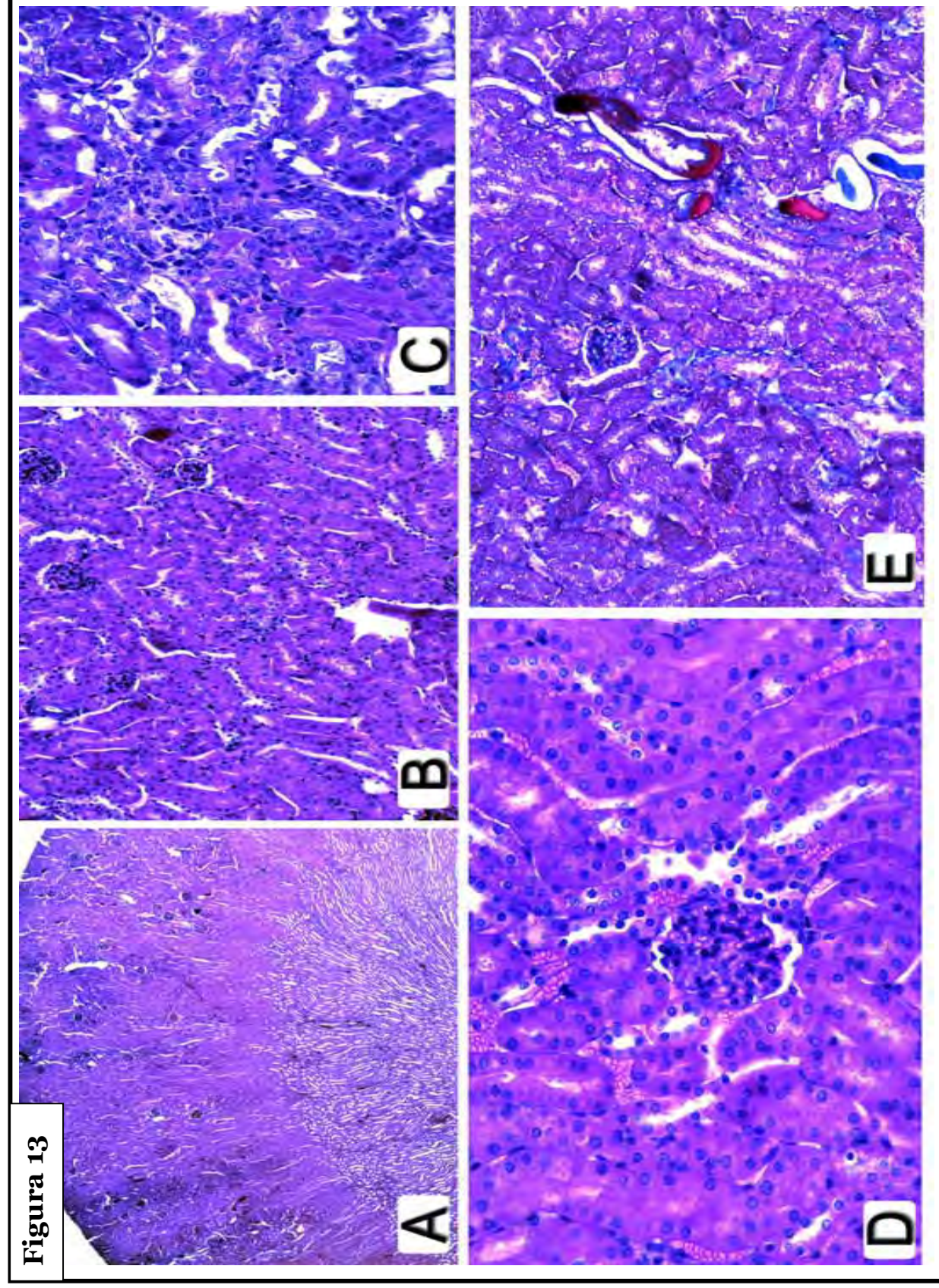


Figura 13. Aspecto histológico dos rins ao fim do estudo nos grupos de tratamento (granuloquine, EPO ou G+EPO). As fotografias são de animais que apresentaram lesão histológica igual a mediana dos grupos. A) Aspecto global (número de áreas de atrofia). Vemos áreas de atrofia, dilatação tubular e fibrose intersticial que se repetem em faixas entremeadas com áreas sem lesão em menor grau do que o grupo controle (HE x 40). B) Detalhe da atrofia e dilatação tubular, característico da nefropatia pela adriamicina, estão presentes em pequena intensidade (HE x 200). C) Infiltrado inflamatório linfomononuclear entre os túbulos de pequena intensidade (HE x 400). D) Detalhe mostrando um glomérulo íntegro (HE x 400) E) Coloração de Masson visando quantificar a intensidade da fibrose. Áreas de fibrose de pequena a moderada intensidade (em azul) entremeadas por áreas sem fibrose (Masson x 200).

Análises de Imunohistoquímica

A análise de imunohistoquímica para o marcador Sca1/LyA6 mostrou uma área de expressão total média de: $1861,59 \pm 567,21 \mu\text{m}^2$ no grupo adriamicina (controle); $4795,99 \pm 1386,59 \mu\text{m}^2$ no grupo granuloquine; $4865,68 \pm 971,51 \mu\text{m}^2$ no grupo eritropoetina e $5676,11 \pm 1054,36 \mu\text{m}^2$ no grupo G+EPO. Todos os grupos de tratamento (granuloquine, EPO e G+EPO) foram diferentes em relação ao controle ($p < 0,0001$), não diferenciando entre si (Tabela 9 e Figura 14).

Tabela 9. Área total média de expressão de Sca1 nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

	N	Sca1 (μm^2)	Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo
Adriamicina	5	1861,59	567,21	1311,4	2804,69
Granuloquine	7	4798,99*	1386,59	3589,23	7207,17
EPO	6	4865,68*	971,51	3850,23	6521,22
G+EPO	6	5676,11*	1054,36	4485,24	6985,23
Total	24	4422,11	1712,81	1311,4	7207,17

* $p < 0,0001$ x adriamicina.

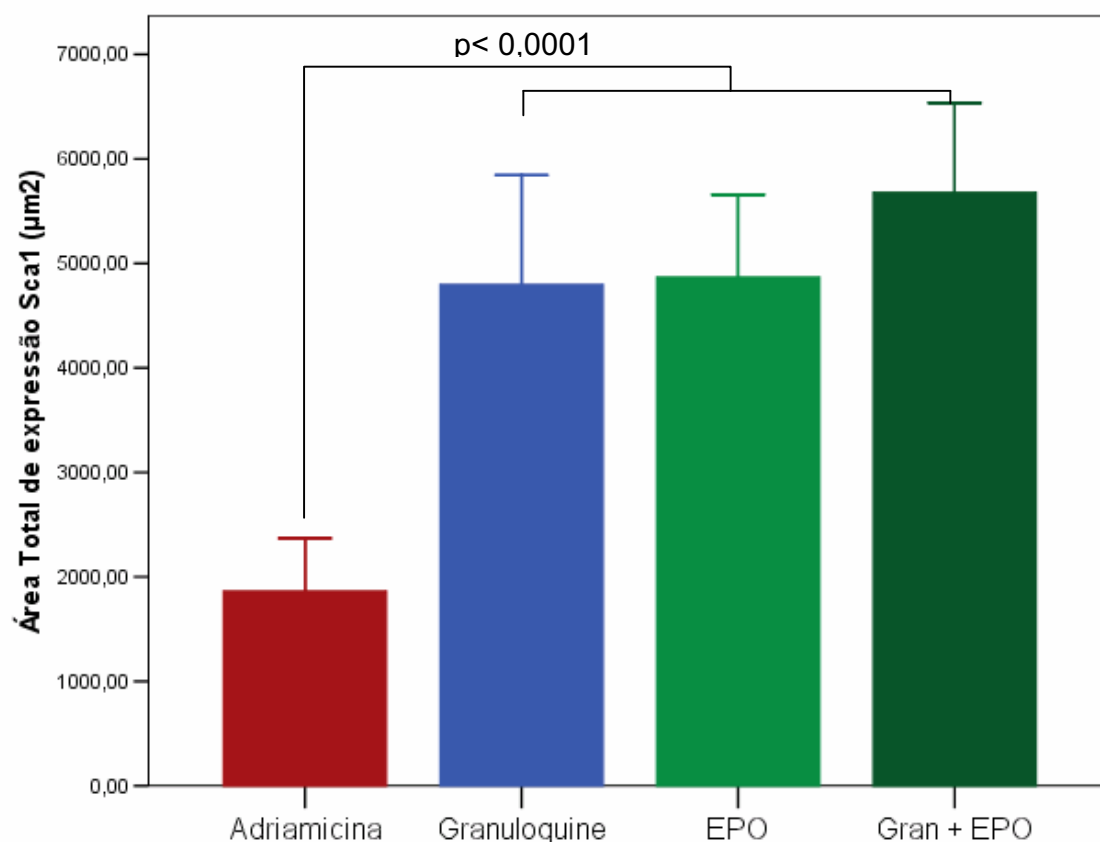


Figura 14. Área Total de expressão de Sca1/LyA6 nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). $p < 0,001$ nos grupos granuloquine, EPO e G+EPO x adriamicina.

A análise de imunohistoquímica para o marcador CD105 mostrou uma área de expressão total média de: $1956,60 \pm 662,31 \mu\text{m}^2$ no grupo adriamicina (controle); $2098,41 \pm 200,59 \mu\text{m}^2$ no grupo granuloquine; $4706,11 \pm 538,99 \mu\text{m}^2$ no grupo eritropoetina e $5291,67 \pm 515,39 \mu\text{m}^2$ no grupo G+EPO. Os grupos de tratamento com eritropoetina (EPO) e granuloquine junto a eritropoetina (G+EPO) foram diferentes em relação ao controle e ao granuloquine

($p < 0,0001$). Não houve diferenças entre os grupos controle e granuloquine ($p = \text{NS}$) (Tabela 10 e Figura 15).

Tabela 10. Área total média de expressão de CD105 nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

	N	CD105 (μm^2)	Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo
Adriamicina	5	1956,60	662,31	1291,05	2804,69
Granuloquine	7	2098,41	200,59	1854,22	2458,22
EPO	6	4706,11*	538,99	4067,02	5428,55
G+EPO	6	5291,67*	515,39	4658,77	5987,45
Total	24	3519,11	1593,11	1291,05	5987,45

* $p < 0,0001$ x adriamicina e granuloquine.

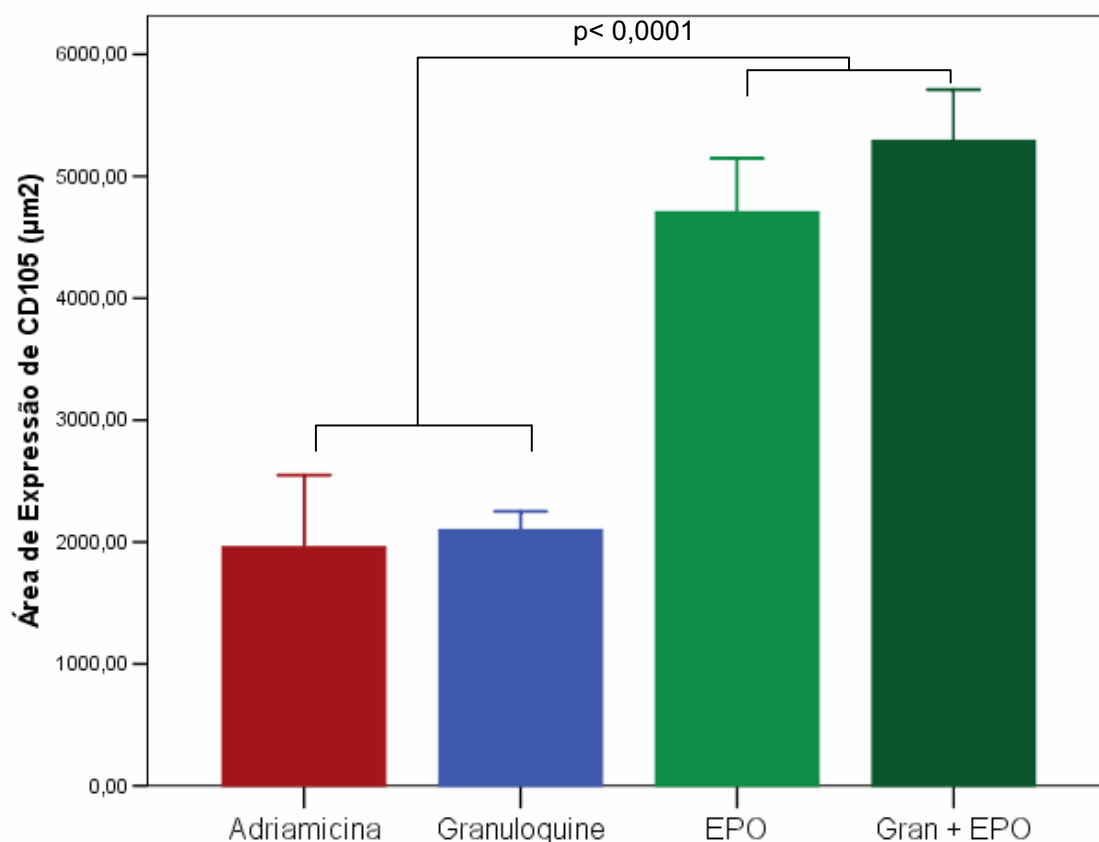


Figura 15. Área Total de expressão de CD105 nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). $p < 0,001$ nos grupos EPO e G+EPO x adriamicina e granuloquine.

A análise de imunohistoquímica para o marcador CD34 mostrou uma área de expressão total média de: $1429,01 \pm 360,80 \mu\text{m}^2$ no grupo adriamicina (controle); $5546,63 \pm 1730,27 \mu\text{m}^2$ no grupo granuloquine; $4405,1 \pm 634,4 \mu\text{m}^2$ no grupo eritropoetina e $4175,18 \pm 166,64 \mu\text{m}^2$ no grupo G+EPO. Todos os grupos de tratamento (granuloquine, EPO e G+EPO) foram diferentes em relação ao controle ($p < 0,0001$), não diferenciando entre si (Tabela 11 e Figura 16).

Tabela 11. Área total média de expressão de CD34 nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina).

	N	CD34 (μm^2)	Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo
Adriamicina	5	1429,01	360,80	1182,75	2051,59
Granuloquine	7	5546,63*	1730,27	3854,77	8768,17
EPO	6	4405,10*	634,40	3560,06	5484,44
G+EPO	6	4175,18*	166,64	3895,66	4367,99
Total	24	4060,55	1763,27	1182,75	8768,17

* $p < 0,0001$ x adriamicina.

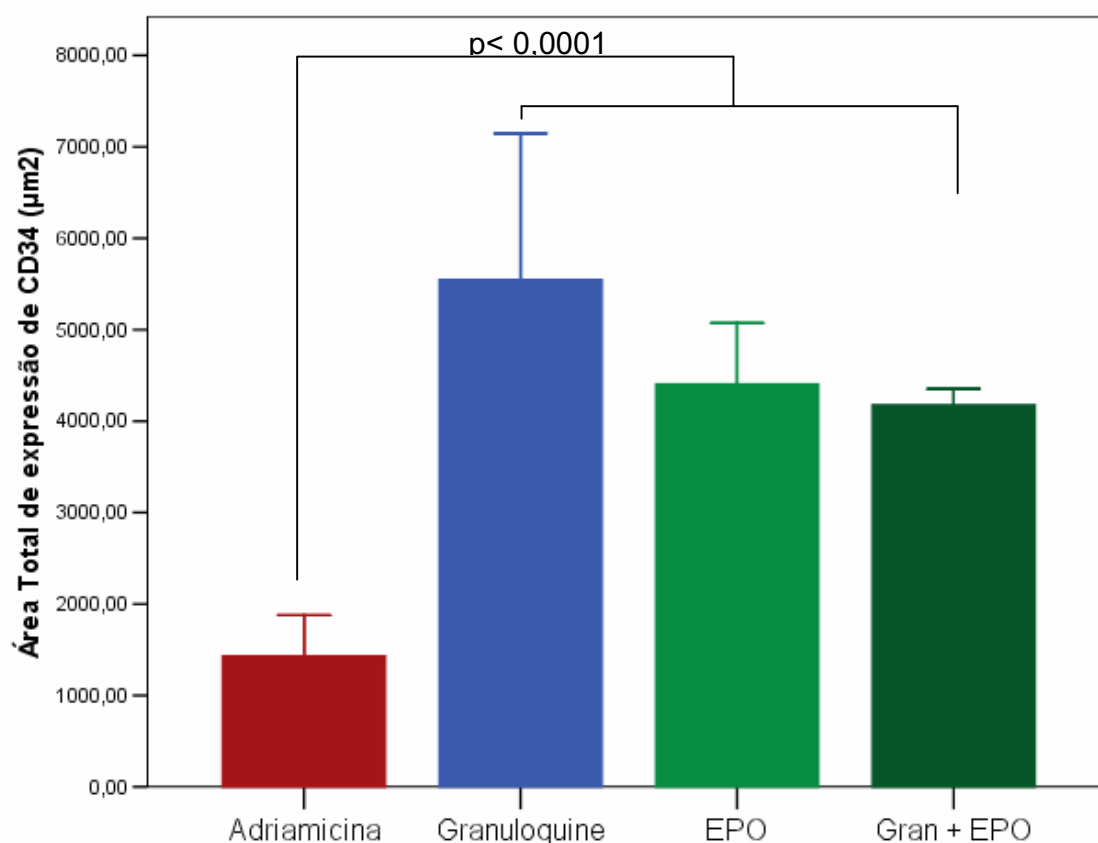


Figura 16. Área Total de expressão de CD34 nos grupos adriamicina, granuloquine, EPO (eritropoetina) e G+EPO (granuloquine + eritropoetina). $p < 0,001$ nos grupos granuloquine, EPO e G+EPO x adriamicina.

A expressão de marcadores de imunohistoquímica mostrou que no grupo controle houve pequena expressão de Sca1, CD105 e CD34 em comparação aos grupos de tratamento (granuloquine, eritropoetina e G+EPO). Apenas no tratamento com granuloquine não houve aumento da expressão de CD105 (Figura 17).

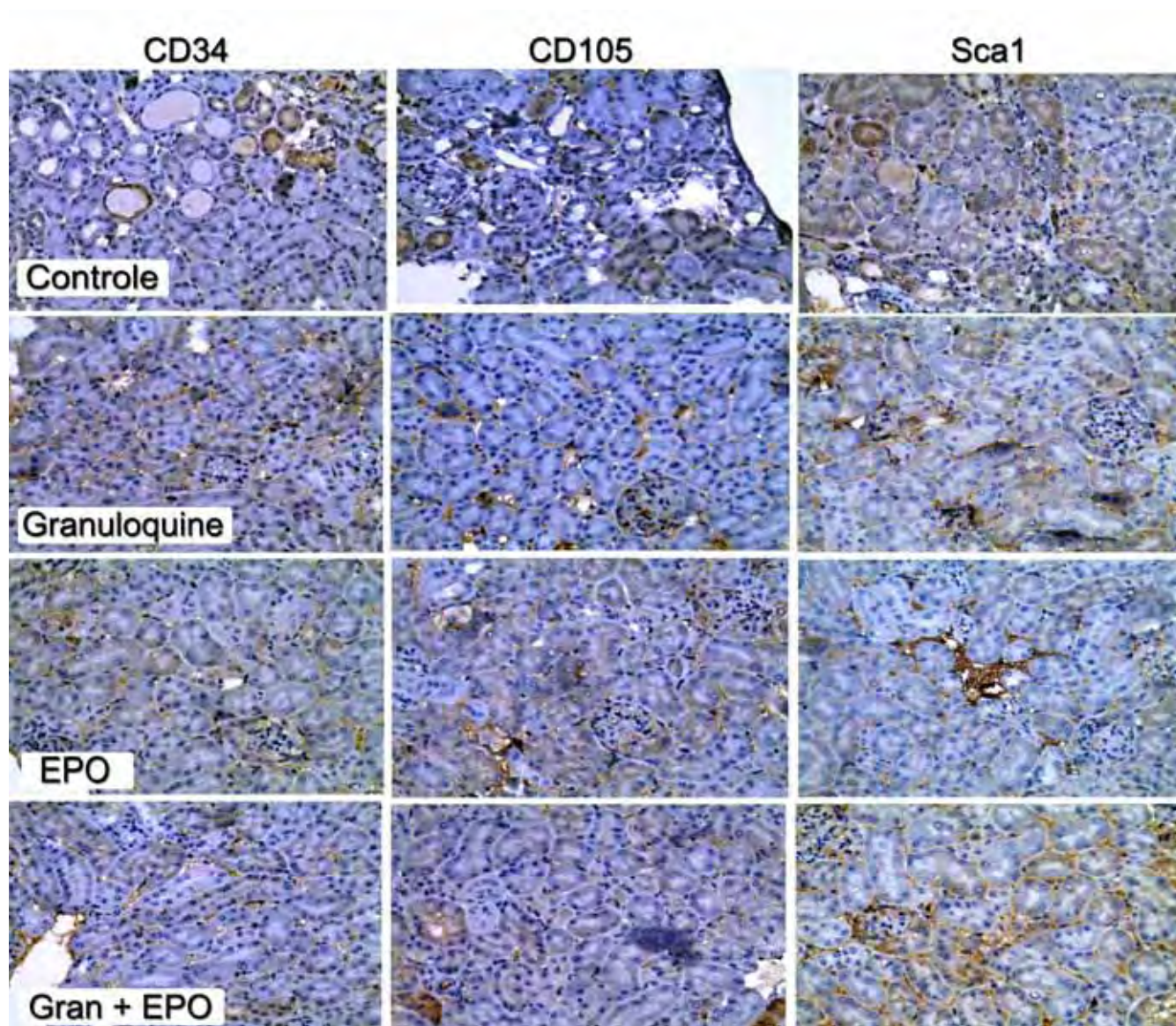


Figura 17. A) Imagens de imunohistoquímica para os reagentes CD34, CD105 e Sca1 (IH 400x). As linhas representam os grupos respectivamente: controle, granuloquine(G), eritropoetina (EPO) e G+EPO. As colunas representam os reagentes respectivamente: CD34, CD105 e Sca1. Os reagentes CD34 e CD105 encontram-se principalmente no espaço intersticial. O reagente Sca1 marca túbulos e o espaço peritubular. Notamos uma redução da expressão dos três marcadores no grupo controle (adriamicina sem tratamento). Nos grupos de tratamento observamos aumento da expressão dos marcadores em todos os grupos com exceção do CD105 no grupo granuloquine. As fotografias representam animais com lesão histológica igual a mediana dos grupos.

Correlações

Realizando análises de correlação em todos os animais do estudo sem divisões por grupo, observamos uma forte correlação entre a expressão de CD34 e a expressão de Sca1 (coeficiente de pearson=0,785; $p<0,0001$), (Figura 18).

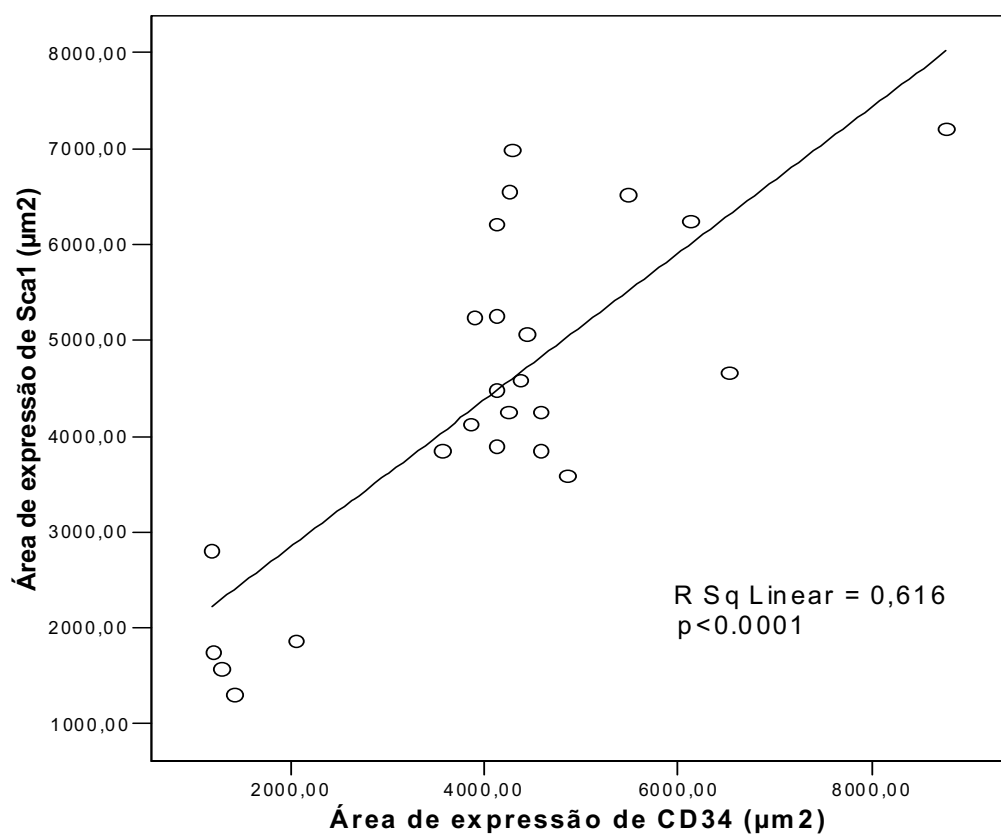


Figura 18. Correlação entre a área de expressão de CD34 e a área de expressão de Sca1 em μm^2 em todos os animais do estudo sem divisão por grupos (coeficiente de pearson=0,785; $p<0,0001$).

Quando comparamos a expressão de Sca1 e CD105 também encontramos correlação positiva (coeficiente de pearson=0,583 e $p=0,003$), (Figura 19).

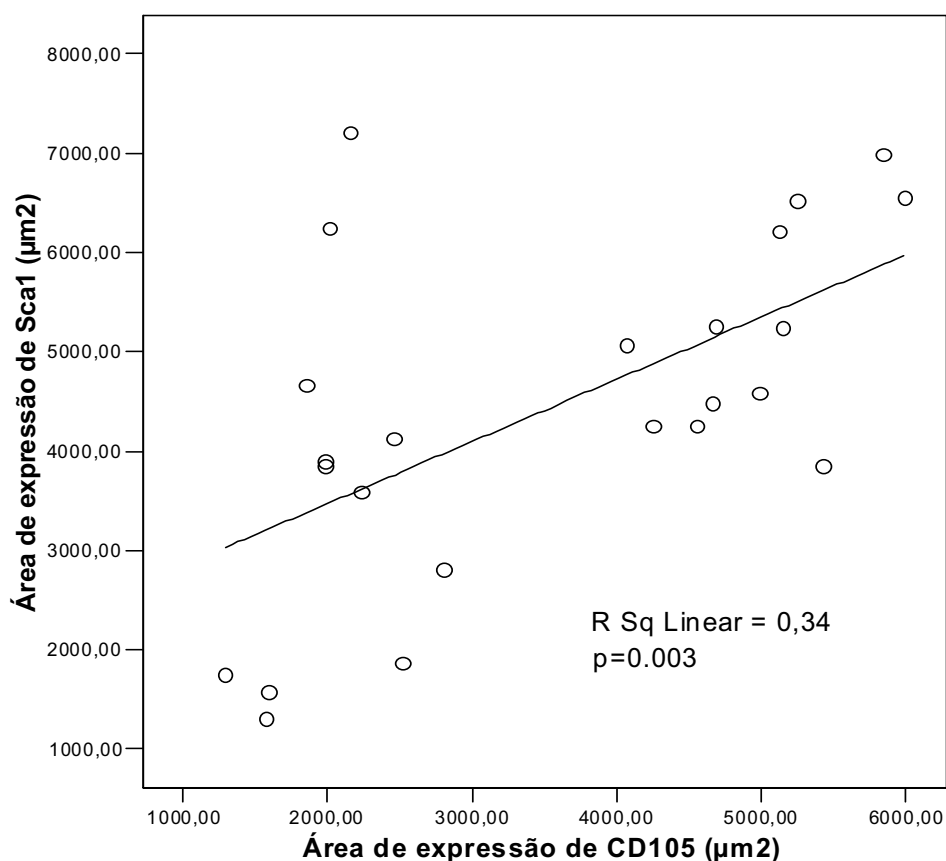


Figura 19. Correlação entre a área de expressão de Sca1 e a área de expressão de CD105 em μm^2 em todos os animais do estudo sem divisão por grupos (coeficiente de pearson=0,583; $p=0,003$).

Quando comparamos a expressão de CD34 frente a expressão de CD105 em μm^2 não obtivemos correlação (coeficiente de pearson=1; $p=0,5$) (Figura 20).

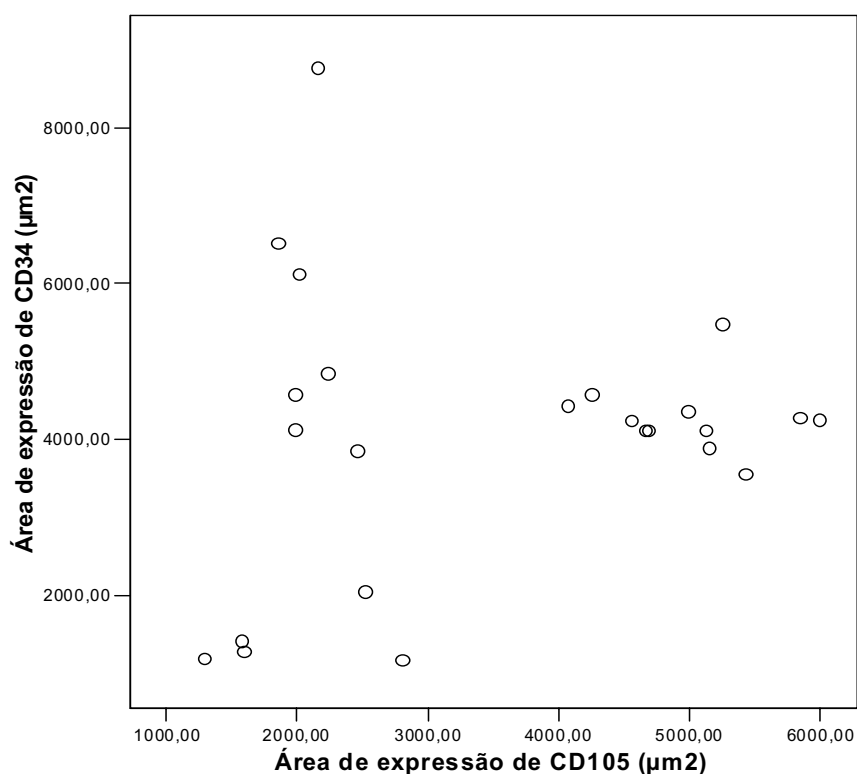


Figura 20. Correlação entre a área de expressão de CD34 e a área de expressão de CD105 em μm^2 em todos os animais do estudo sem divisão por grupos (coeficiente de pearson=1; p=NS).

Das correlações apresentadas, podemos notar uma forte associação entre os marcadores de progenitores hematopoiéticos e endoteliais (Sca1 e CD34), uma correlação moderada entre progenitores hematopoiéticos e mesenquimais (Sca1 e CD105) e ausente entre progenitores endoteliais e mesenquimais (CD34 e CD105).

As correlações dos marcadores de progenitores endoteliais (CD34) com os parâmetros histológicos mostraram que com o progredir da lesão houve redução de sua expressão. O número de áreas de atrofia correlacionou-se

negativamente com a área total de expressão de CD34 (coeficiente de pearson=-0,751; $p<0,0001$). A percentagem de esclerose glomerular e a intensidade da fibrose intersticial da mesma forma também se correlacionaram negativamente com a expressão de CD34, respectivamente: coeficiente de pearson=-0,745; $p<0,0001$ e pearson=-0,637; $p=0,001$. (Figura 21).

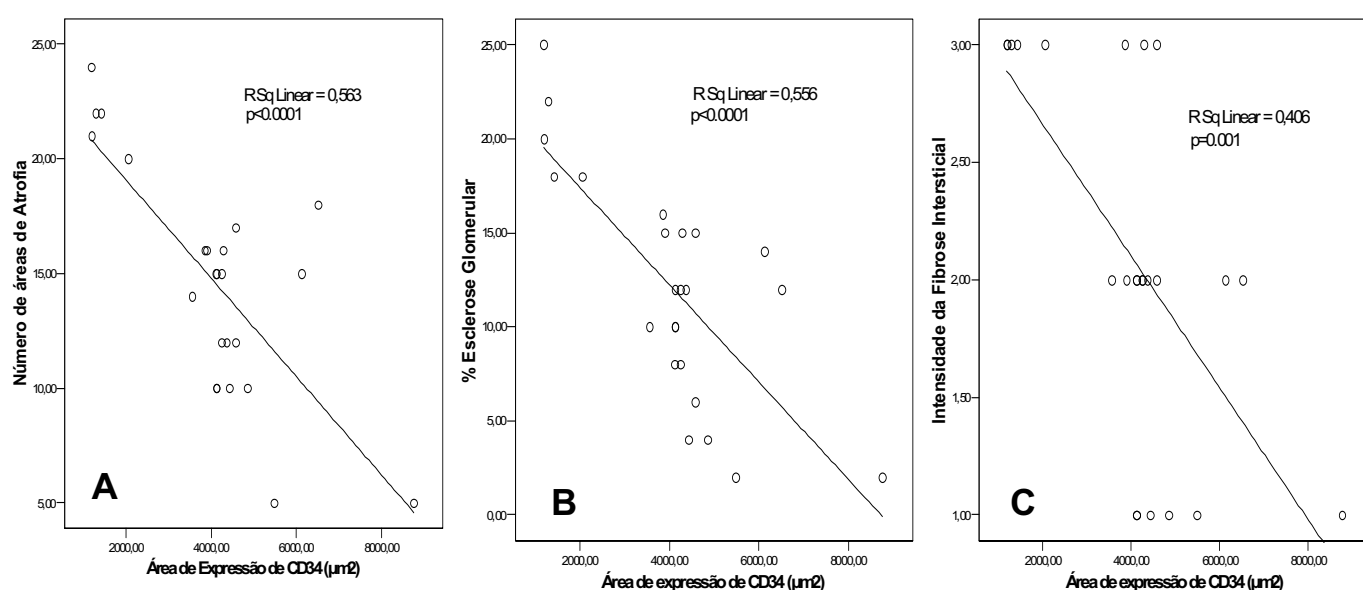


Figura 21. Correlação de parâmetros histológicos com a expressão de CD34. A) Correlação do número de áreas de atrofia com CD34 (pearson=-0,751; $p<0,0001$). B) Percentagem de esclerose glomerular e expressão de CD34 (pearson=-0,745; $p<0,0001$). C) Intensidade da fibrose intersticial com a expressão de CD34 (pearson=-0,637; $p=0,001$).

As correlações dos marcadores de progenitores hematopoiéticos (Sca1) com os parâmetros histológicos mostraram que com o progredir da lesão houve redução de sua expressão. O número de áreas de atrofia correlacionou-

se negativamente com a área total de expressão de Sca1 (coeficiente de pearson=-0,70; $p<0,0001$). A percentagem de esclerose glomerular e a intensidade da fibrose intersticial da mesma forma também se correlacionaram negativamente com a expressão de Sca1, respectivamente: coeficiente de pearson=-0,586; $p=0,003$ e pearson=-0,565; $p=0,004$. (Figura 22).

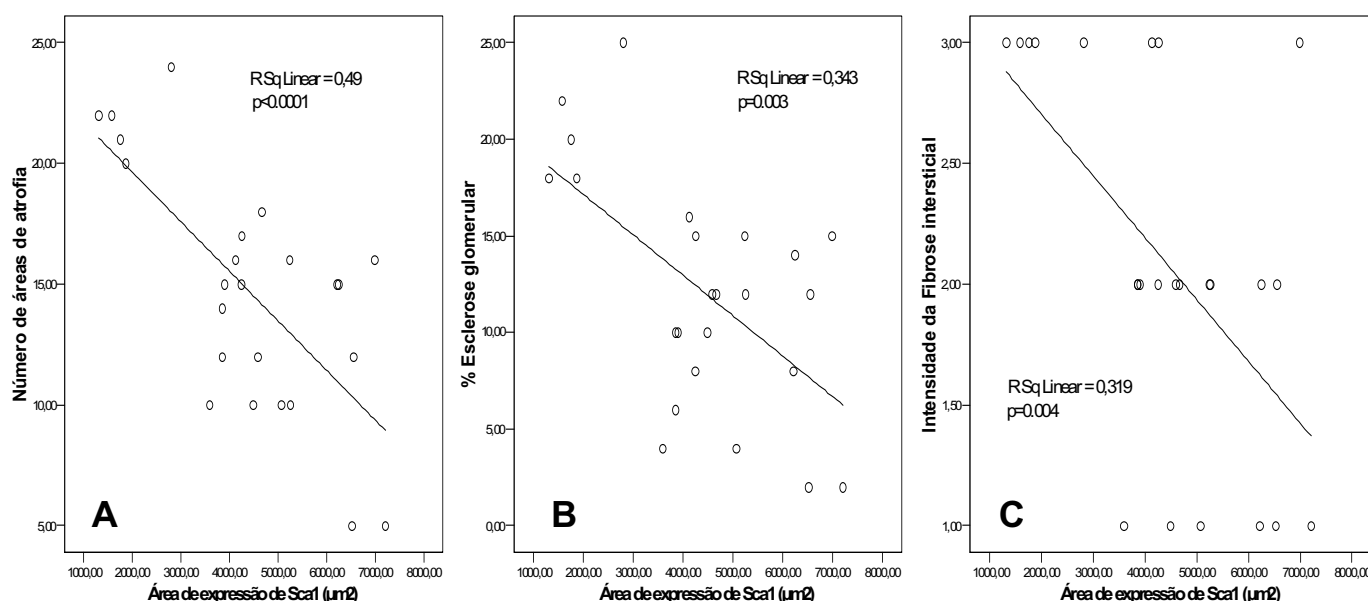


Figura 22. Correlação de parâmetros histológicos com a expressão de Sca1. A) Correlação do número de áreas de atrofia com Sca1 (pearson=-0,70; $p<0,0001$). B) Percentagem de esclerose glomerular e expressão de Sca1 (pearson=-0,586; $p<0,003$). C) Intensidade da fibrose intersticial com a expressão de Sca1 (pearson=-0,565; $p=0,004$).

As correlações dos marcadores de progenitores mesenquimais (CD105) com os parâmetros histológicos não mostraram correlação com a severidade da lesão histológica. O número de áreas de atrofia apresentou tendência de correlação com a área total de expressão de CD105 (coeficiente de pearson=-

0,397; $p=0,055$). A percentagem de esclerose glomerular e a intensidade da fibrose intersticial não se correlacionaram com a expressão de CD105, respectivamente: coeficiente de pearson=-0,265; $p=0,211$ e pearson=-0,288; $p=0,172$. (Figura 23).

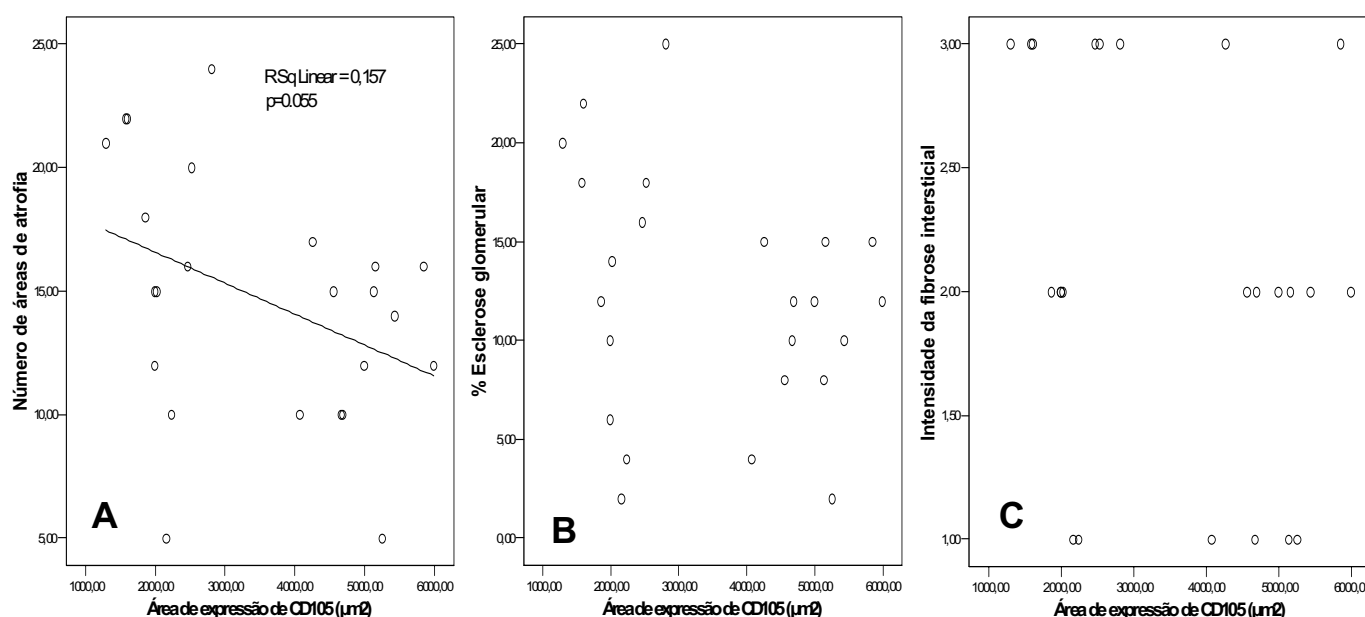


Figura 23. Correlação de parâmetros histológicos com a expressão de CD105. A) Correlação do número de áreas de atrofia com CD105 (pearson=-0,397; $p=0,055$). B) Percentagem de esclerose glomerular e expressão de CD105 (pearson=-0,265; $p=NS$). C) Intensidade da fibrose intersticial com a expressão de CD105 (pearson=-0,288; $p=NS$).

Discussão

No presente estudo tentamos provar o benefício do uso de fatores de tropismo para células-tronco em um modelo de doença renal crônica no início da agressão. O modelo escolhido foi o da adriamicina em camundongos descrito por Wang(74). Neste modelo os camundongos desenvolvem doença renal proteinúrica semelhante a GESF de maneira precoce e uniforme após uma semana da infusão. Testamos, assim, a ação de dois fatores de tropismo para células-tronco (eritropoetina e granuloquine) isoladamente ou em associação no início da agressão renal (concomitante a infusão de adriamicina) e nos dias subseqüentes da primeira semana onde a lesão renal proteinúrica se estabelece, totalizando cinco dias de tratamento.

Com a análise dos resultados observamos que o peso inicial dos animais foi semelhante sugerindo homogeneidade entre os grupos de estudo assegurando, assim a correta distribuição entre controle e tratamentos. As medidas dos pesos renais ao fim do estudo também não se mostraram diferentes entre os grupos bem com os pesos finais dos animais.

Efeito dos Fatores de Tropismo sobre a Função renal e albumina

Os resultados das análises bioquímicas mostraram que os valores de creatinina não foram diferentes estatisticamente entre os grupos controle e tratamento. Esperávamos uma redução da creatinina nos grupos tratados o que não foi encontrado. Entretanto, numa parcela desses animais, não foi possível obter amostras suficientes para as análises bioquímicas aumentando o número de dados faltosos. Assim, uma possível explicação para a ausência de benefício entre os grupos foi insuficiência de amostras na análise bioquímica. O cálculo do erro beta para a creatinina foi menor que 80% sugerindo cautela na interpretação de resultados negativos.

Quanto à detecção da creatinina, Keppler et al., compararam o método colorimétrico do ácido pícrico (Jaffé) com o método enzimático e a cromatografia líquida de alta performance em ratos e camundongos. O método de Jaffé superestimou a creatinina de forma mais intensa que a cromatografia líquida e que o método enzimático, embora todos superestimem seus valores. Houve, entretanto, boa correlação entre as três metodologias. A dosagem pela técnica de Jaffé sofre, porém, maior interferência com os níveis de hemoglobina podendo causar elevações em seus valores. Esta interferência é

menos intensa no método de cromatografia líquida e no método enzimático(82).

Assim, devemos também aventar a possibilidade de interferência nas dosagens de creatinina pelo método colorimétrico nos grupos EPO e G+EPO devido ao efeito da eritropoetina, usada no tratamento desses grupos, levando a uma provável elevação da hemoglobina e conseqüente interferência nas dosagens de creatinina. Assim, acreditamos que as interpretações dos resultados de creatinina foram prejudicadas.

Os dados bioquímicos de albumina mostram resultados semelhantes à análise da creatinina. Esperávamos encontrar redução da albumina de forma mais expressiva no grupo de adriamicina sem tratamento. De forma semelhante, em uma parcela destes animais também não foi possível obter amostras suficientes para as dosagens de albumina. Como nas dosagens de creatinina, a presença de dados faltosos pode ser uma possível explicação para resultados negativos já que o erro beta calculado aqui também foi menor que 80%. Assim, a interpretação da ausência de significância estatística não pode ser avaliada de forma definitiva, já que o número de casos dos grupos pode ter sido insuficiente.

No modelo de lesão renal da adriamicina em camundongos de Wang et al., a albumina é significativamente menor no grupo adriamicina na primeira e

quarta semanas, entretanto, ao fim do estudo (6 semanas) a albumina nos grupos controle (injeção de salina) e adriamicina não são diferentes(74). Assim, os resultados encontrados no presente estudo podem corresponder apenas a ausência de alteração da albumina entre os grupos tratados e não tratados ao fim do mesmo período (6 semanas).

Efeito dos Fatores de Tropismo sobre a lesão renal – parâmetros histológicos

De forma contrária à análise bioquímica, as análises histológicas apontam para um efeito protetor nos grupos tratados. No grupo tratado com granulokine houve redução do número de áreas de atrofia, menor intensidade de fibrose e menor percentagem de glomérulos esclerosados quando comparado ao grupo controle. Nos modelos de insuficiência renal aguda a maioria dos trabalhos esta de acordo com nossos resultados sugerindo efeito protetor do G-CSF sobre a função renal e/ou parâmetros histológicos(44-46). Nishida et al.(46) e Iwasaki et al.(45), ambos com modelos de IRA por cisplatina obtiveram melhora na função renal e redução do número de células tubulares apoptóticas com o tratamento com G-CSF. Fang et al.(44), com modelo de IRA por ácido fólico, também obtiveram melhora nos índices de injúria tubular e redução dos níveis de uréia nos animais tratados com G-CSF. Contrariamente a esses resultados, Togel et al.(47), em modelo de IRA por isquemia-reperfusão demonstraram piora da função renal nos grupos tratado com G-CSF. Essa piora obtida tanto na função renal quanto na sobrevivência dos animais foi atribuída a granulocitose resultante da mobilização de células-tronco hematopoiéticas. Já em modelos de insuficiência renal crônica como o

do presente trabalho, são poucos os estudos que testaram o efeito do fator G-CSF. Stokman et al., estudaram o efeito do G-CSF sobre um modelo de insuficiência renal crônica por obstrução ureteral unilateral. Estes autores não encontraram benefícios do tratamento sobre a função renal, número de miofibroblastos, deposição de colágeno e expressão de TGF- β sugerindo ausência de efeito do G-CSF nesse modelo de IRC. Apesar da ausência de benefício houve efetiva mobilização de células-tronco hematopoiéticas(50). No estudo de Zhang et al. [apenas resumo], no mesmo modelo de obstrução ureteral unilateral o tratamento com G-CSF e CSF não promoveram melhora da função renal embora tenha sido demonstrada a mobilização de células-tronco progenitoras endoteliais (CD34⁺)(83).

Assim, de acordo com revisão bibliográfica até o momento, nosso estudo foi o primeiro a demonstrar proteção histológica do fator G-CSF num modelo de insuficiência renal crônica.

A análise histológica do grupo eritropoetina se comportou como o grupo tratado com granulopoeia. Houve, de forma semelhante, redução do número de áreas de atrofia, menor intensidade de fibrose e menor percentagem de glomérulos esclerosados quando comparado ao grupo controle. Os estudos que trataram insuficiência renal aguda com eritropoetina também obtiveram melhora da função renal. Imamura et al.(57), Kapoor et al.(58) e Yang et

al.(59), em modelos de insuficiência renal aguda por isquemia-reperfusão obtiveram proteção do insulto isquêmico tubular nos grupos tratados. Imamura et al., demonstraram que a administração de EPO aumentou a expressão de HF-1 e VEGF reduzindo o número de células tubulares apoptóticas(57). Nos modelos de insuficiência renal aguda por cisplatina de Bagnis et al.(60), Yalcin et al.(61), o tratamento com EPO também resultou em melhora da lesão isquêmica. Bagnis et al., demonstraram que a IRA por cisplatina foi atenuada pela administração de EPO obtendo melhora da função renal e aumento da regeneração tubular. O provável mecanismo de ação proposto foi o estímulo direto sob a regeneração das células tubulares(60). Afora os trabalhos experimentais, a eritropoetina foi usada em um trabalho clínico de intervenção, onde pacientes candidatos a cirurgia de revascularização do miocárdio (alto risco de IRA), foram tratados com EPO na dose de 300UI/kg antes da cirurgia. A ocorrência de IRA (definida como aumento da creatinina maior que 50%) foi menor no grupo tratado com EPO (8% x 29%, $p=0,035$)(84). Os resultados deste trabalho já mostram, ainda que de forma inicial, o uso da eritropoetina em ensaios clínicos com seres humanos em risco de insuficiência renal aguda.

Diferentemente da insuficiência renal aguda, são poucos os modelos que testaram EPO em insuficiência renal crônica até o momento. Noiri et al., no

modelo de adriamicina em ratos demonstraram que a administração de um análogo da EPO de longa duração (darbepoetina na dose de 3 e 30µg/kg) resultou em melhora da creatinina e melhora da área de fibrose intersticial no grupo tratado(66). Bahlmann et al., também utilizando a darbepoetina (0.1µg/kg) em modelo de nefrectomia 5/6 observaram proteção no grupo tratado com darbepoetina. Esses autores encontraram melhora da sobrevida no grupo tratado e melhora do índice de lesão histológica (esclerose vascular, glomeruloesclerose e fibrose intersticial)(85). Chama a atenção no trabalho de Bahlmann et al.(85) que os resultados positivos foram obtidos com doses baixas de darbepoetina, ao contrário, dos estudos com EPO onde os benefícios foram encontrados com a administração de doses elevadas. Kang et al., também utilizando a darbepoetina (0.4µg/kg) no mesmo modelo de nefrectomia 5/6 encontraram proteção nos grupos tratados com melhora da função renal e menor índice de fibrose. Esses autores observaram aumento da proliferação endotelial nos glomérulos atribuída ao aumento da expressão de VEGF estimulados pela EPO(86). De forma semelhante, aos trabalhos de Noiri et al.(66), Bahlmann et al.(85) e Kang et al.(86), também encontramos proteção histológica nos camundongos tratados com EPO.

O grupo de tratamento com ambos os fatores combinados (EPO+G-CSF) apresentou resultados semelhantes ao grupo EPO e G-CSF isolados (redução

do número de áreas de atrofia, menor intensidade de fibrose e menor percentagem de glomérulos esclerosados), entretanto, não observamos efeito aditivo das medicações. Ou seja, o benefício isolado de cada um dos fatores não foi somado e os parâmetros histológicos encontrados foram semelhantes a cada um deles isolados.

Efeito dos Fatores de Tropismo sobre a migração de células-tronco

Iwasaki et al.(45), demonstraram que a presença de células-tronco das linhagens hematopoiéticas e progenitores endoteliais ($\text{Lin}^- \text{CD34}^+$, $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+$ e $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$) estavam aumentadas por efeito da administração de G-CSF em modelo de IRA. Esses autores também demonstraram o tropismo destas células-tronco marcadas com flurosceína para o tecido renal lesado nos grupos tratados com G-CSF. Fang et al.(44), em modelo de IRA por ácido fólico, submetidos a transplante de medula de camundongos machos para fêmeas e tratamento com G-CSF demonstraram a presença de células-tronco contendo o cromossomo Y nas células tubulares lesadas. Estes resultados sugerem que a proteção exercida pelo G-CSF pode ser devido à mobilização de células-tronco. Já Nishida et al.(46), apesar do benefício sobre a função renal, em seu modelo de IRA, não conseguiram demonstrar o aumento do número de células-tronco que expressam os marcadores de superfície CD34, c-kit e CD45 por imunohistoquímica nos tecidos renais dos animais tratados com G-CSF. Nos modelos de IRC, Stokman et al.(50), puderam demonstrar que a administração de G-CSF promoveu mobilização de células-tronco hematopoiéticas (c-Kit/Sca-1) no sangue periférico e que estas células

migraram para o rim obstruído (modelo de obstrução ureteral unilateral) porém não demonstraram benefícios sobre a função renal e parâmetros histológicos. Em resumo, parece haver evidências que o fator G-CSF estimula a mobilização de células-tronco hematopoiéticas e progenitoras endoteliais endógenas, sendo este um importante mecanismo de ação.

No presente estudo, o grupo tratado com granuloquine, apresentou aumento da expressão de dois marcadores (CD34 e Sca1) sugerindo mobilização de células-tronco adultas da linhagem hematopoiética como responsáveis pelo menor grau de lesão tecidual em relação ao controle. Os marcadores Sca1 e CD34 sugerem aumento das linhagens hematopoiéticas e endoteliais respectivamente. O marcador CD105, representante da linhagem mesenquimal, não estava aumentado neste grupo sugerindo ausência de mobilização pelo granuloquine. De forma semelhante, Iwasaki et al.(45) e Stokman et al.(50), também demonstraram que a mobilização de progenitores hematopoiéticos/endoteliais ocorreu com a administração de granuloquine.

A eritropoetina também exerce efeito sobre a mobilização de células-tronco. Semelhante ao granuloquine, sua ação ocorre de forma mais intensa na mobilização de progenitores endoteliais. Heeschen et al., demonstraram que o tratamento com EPO resultou em mobilização de progenitores endoteliais (CD34⁺Flk-1⁺) no sangue periférico de camundongos tratados com o fator.

Um disco implantado no subcutâneo desses animais apresentou neovascularização no grupo EPO o que não ocorreu no controle tratado com salina. Os autores sugerem a migração das células progenitoras mobilizadas pela EPO e conseqüente neovascularização(56). Com a eritropoetina, no entanto, as linhagens de células-tronco mesenquimais também podem ser estimuladas. Bi et al., em um experimento de IRA por cisplatina com camundongos B57BL/6J tratados com EPO 1.000UI/kg encontraram melhora da função renal nos animais tratados. Esses autores demonstraram a presença de receptores de EPO nas linhagens mesenquimais e que o cultivo destas células in vitro junto com EPO resultou em estímulo para sua proliferação. O tratamento com EPO também resultou em aumento no número de células mesenquimais ($CD45^-Flk1^-CD105^+$) na medula óssea dos camundongos. Adicionalmente foi demonstrado o aumento na circulação de células progenitoras endoteliais ($CD45^-Flk1^+$)(87). Assim, Bi et al.(87), demonstraram a participação da EPO na mobilização de precursores mesenquimais além dos já conhecidos progenitores endoteliais. Em resumo, a EPO estimula a mobilização de progenitores endoteliais e mais recentemente tem sido demonstrada sua ação na mobilização da linhagem mesenquimal.

No presente estudo, o grupo eritropoetina apresentou aumento da expressão de Sca1 e CD34 sugerindo participação da linhagem de

progenitores hematopoiéticos e endoteliais no reparo da lesão renal como descrito por Heeschen et al.(56). O aumento da expressão de CD105 sugere a participação de progenitores mesenquimais como já descrito por Bi et al.(87).

Também se atribui a eritropoetina uma importante ação na preservação da microcirculação renal. De forma semelhante o estudo de Hohenstein et al., mostrou que lesão ao sistema endotelial de rins de ratos levou a produção de uma série de fatores angiogênicos após 30 minutos da agressão. Estes fatores atuaram tanto no recrutamento de células progenitoras endoteliais e hematopoiéticas quanto diretamente na preservação das células endoteliais. A injeção de doses elevadas de eritropoetina após 2 horas da agressão levou a uma redução marcante na lesão da microcirculação renal(88).

Em conclusão, no presente estudo não medimos a mobilização de células-tronco no sangue periférico com a administração de G-SCF ou EPO através de técnicas de citometria de fluxo, porém fomos capazes de demonstrar a presença de linhagens hematopoiéticas ($Sca1^{+}$), progenitoras endoteliais ($CD34^{+}$) e progenitoras mesenquimais ($CD105^{+}$) no tecido renal por técnica de imunohistoquímica. Estas análises, tanto da linhagem progenitora endotelial quanto mesenquimal apontam para uma maior expressão nos grupos de tratamento. Quando analisamos o controle negativo (rim de camundongo não submetido a infusão de adriamicina) observamos uma expressão reduzida

destas três linhagens. Já nos grupos em estudo ocorreu um aumento de expressão que foram significativamente maiores nos grupos de tratamento (granuloquine, EPO e G+EPO). Apenas no grupo tratado com granuloquine, as linhagens progenitoras mesenquimais não estavam aumentadas.

Usando análises de correlações notamos uma forte associação entre os marcadores de progenitores hematopoiéticos e endoteliais (Sca1 e CD34), uma correlação moderada entre progenitores hematopoiéticos e mesenquimais (Sca1 e CD105) e ausente entre progenitores endoteliais e mesenquimais (CD34 e CD105). Através de correlações com parâmetros histológicos podemos inferir que as células progenitoras hematopoiéticas e endoteliais estão aumentadas no tecido renal sem fibrose conferindo proteção. Já os progenitores mesenquimais não se associaram a melhora histológica. Como demonstrado por Magnasco et al.(37), e Choi et al.(36), o primeiro com modelo de nefropatia por adriamicina e o segundo com modelo de nefrectomia 5/6 a administração de células-tronco mesenquimais não foram capazes de modificar a evolução da nefropatia nestes modelos de insuficiência renal crônica. De forma contrária, Semedo et al., no modelo de doença renal crônica por nefrectomia 5/6, demonstraram que a administração de células-tronco mesenquimais correlacionou-se com menor fibrose no tecido renal(89). Cavaglieri et al., de forma semelhante e também em modelo de nefrectomia

5/6 demonstraram que a infusão de células-tronco mesenquimais em ratos Wistar resultou em proteção com queda da creatinina e redução da glomeruloesclerose(90).

Assim, acreditamos que no presente estudo de lesão renal crônica pela adriamicina, o benefício alcançado deve-se aos progenitores hematopoiético/endoteliais mais do que aos progenitores mesenquimais. Creditamos parte do efeito benéfico dos progenitores hematopoiéticos na preservação dos capilares peritubulares. Como demonstrado por alguns autores, os capilares peritubulares estão associados a estes progenitores. Li et al., demonstraram que a infusão de células-tronco hematopoiéticas, no modelo de IRA por isquemia-reperfusão, promoveu o aumento do número de capilares peritubulares e a preservação da função renal nos grupos tratados. As células-tronco hematopoiéticas adquiriram marcadores de células endoteliais e incorporaram-se na microcirculação atenuando a lesão isquêmica de forma direta e também por ação parácrina(91). Assim, dois recentes estudos apontam as células progenitores endoteliais/hematopoiéticas e os capilares peritubulares como importantes para a preservação da função renal(88;91).

Em resumo, no presente estudo, tanto o granuloquine quanto a eritropoetina foram responsáveis pela mobilização de progenitores hematopoiéticos/endoteliais que estiveram fortemente associados entre si e

que se associaram a menor severidade de lesão histológica. A eritropoetina, adicionalmente, também foi responsável pela mobilização de progenitores mesenquimais, porém, sem tradução na melhora histológica. Os grupos de tratamentos somados (granulopoeia + eritropoetina) não obtiveram ganho adicional. Para explicarmos este resultado postulamos duas teorias: a ausência de ação de progenitores mesenquimais neste modelo e a ausência de efeito aditivo sobre as linhagens hematopoiéticas. O tratamento combinado leva a mobilização de linhagens mesenquimais e hematopoiéticas. Supondo a ausência de ação da linhagem mesenquimal, explicamos a ausência de ganho na combinação de G-CSF com EPO. Adicionalmente ambos os fatores também agem nas linhagens hematopoiéticas e o tratamento combinado não exerceu efeito aditivo, ou seja, a combinação dos fatores não se traduziu em maior estímulo de “homing”.

Deve-ser ressaltar que como não foi realizada a infusão direta de linhagens hematopoiéticas e mesenquimais não é possível afirmar incontestavelmente que a linhagem mesenquimal não confere proteção. A conclusão de que a linhagem mesenquimal não conferiu proteção no presente trabalho é indireta e baseou-se em análise de correlações com os parâmetros histológicos. Outro ponto que merece destaque é o papel de cada linhagem de célula-tronco endógena e exógena. Os trabalhos que mostraram benefícios das

linhagens mesenquimais nos modelo de IRC(89;90) obtiveram estes resultados com a infusão de células-tronco adultas exógenas da medula. As células-tronco endógenas(24), que são as estimuladas pelos fatores de tropismo como o G-CSF e EPO, podem apresentar comportamento diverso.

Células-Tronco Adultas extra-medula

Recentemente, o trabalho de muitos pesquisadores, tem se voltado para a procura de células-tronco residentes em tecidos extra-medula como o rim(18;92;93). O processo de identificação de células tronco residentes em órgãos extra-medula é difícil, porém podemos usar algumas características próprias das células-tronco como o ciclo celular lento. Assim utilizando um marcador de DNA como o bromodeoxiuridina (BrdU), podemos identificá-las pela retenção prolongada do marcador(19). Com esta metodologia, Oliver et al.(93), puderam identificar na papila renal células com estas características. O isolamento deste grupo de células, in vitro, mostrou uma alta capacidade de diferenciação estimulada pela redução da tensão de O₂. Estas células quando injetadas no córtex renal se incorporaram no parênquima. Os autores concluíram que a papila renal é um importante nicho extra-medula de células-tronco. Utilizando metodologia semelhante, Maeshima et al.(92), demonstraram, em rins de ratos, a presença de células-tronco entre as células epiteliais tubulares com capacidade de proliferação e diferenciação em túbulos frente a insultos isquêmicos. Os autores concluem que estas células residentes nos túbulos renais são uma fonte de renovação após injúria celular sendo um nicho extra-medula de células progenitoras. Células-tronco adultas também

foram identificadas em células parietais da cápsula de Bowman em rins de ratos. Estas células isoladas e colocadas em meios apropriados de cultura foram capazes de originar células tubulares(21).

Lee et al., isolaram uma linhagem de células progenitoras em rins de camundongos e demonstraram que sua infusão, no modelo de isquemia-reperfusão, foi capaz de atenuar a lesão isquêmica. As células progenitoras foram caracterizadas por um método diferente da marcação de DNA por BrdU descrito acima. Elas foram caracterizadas pela expressão de marcadores específicos confirmados por imunohistoquímica (Oct-4; CD29; Pax-2). Estas células injetadas diretamente no parênquima renal de camundongos, submetidos a injúria de isquemia-reperfusão, atenuaram a lesão renal. A análise de imunohistoquímica após 30 dias da infusão demonstrou aumento da expressão de marcadores CD34 e E-caderina(94).

Assim em resumo, utilizando métodos de marcação de DNA, cultura celular ou por meio de marcadores específicos (CD24, CD133, Sca1, Oct-4) foi possível isolar em rins de animais de experimentação nichos de células-tronco em diversos compartimentos. Foram identificadas células na papila, no túbulo proximal, no interstício e nas células parietais da cápsula de Bowman com predominância para o túbulo proximal. A maioria destas células tiveram capacidade de se diferenciar em células tubulares(19).

A taxa de renovação das células renais é baixa em condições normais sendo estimada em 0,22-0,33%; 0,4% e 0,45% respectivamente para as células epiteliais tubulares, células dos capilares peritubulares e o endotélio dos glomérulos(95). Estes dados sugerem a presença de uma região onde existam células com maior capacidade de renovação principalmente frente a insultos que necessitem de replicações celulares mais rápidas. Os estudos apresentados evidenciam que o rim pode ser um nicho extra-medula contribuindo, assim, como uma fonte de células progenitoras.

Como possível limitação do ensaio do presente estudo não podemos precisar a origem das células-tronco. Assim os fatores de tropismo (granuloquine e eritropoetina) foram capazes de efetiva mobilização de progenitores hematopoiéticos e mesenquimais, porém não confirmamos a origem de tais células (medula óssea x tecido extra-medula). Diversos autores demonstraram que o granuloquine, tanto em modelos de IRA(44;45) quanto IRC(50;83), foi um fator estimulante de tropismo para células-tronco oriundas da medula. De maneira semelhante, alguns autores também comprovaram a mobilização de células-tronco da medula pela ação da Eritropoetina(56;87). No entanto, é possível, em teoria, que ambos os fatores atuem no microambiente das células-tronco do tecido renal propiciando estímulos para

sua diferenciação quando frente a insultos de injúria celular e conseqüente necessidade de replicação.

Outras Ações dos Fatores de Tropismo: G-CSF

Diversos autores conseguiram provar que a aplicação do fator G-CSF estimula a liberação de células-tronco hematopoiéticas e/ou progenitoras endoteliais(44;45;50), entretanto, outros trabalhos(46;49) obtiveram benefícios com o uso de G-CSF sem, no entanto, demonstrarem a efetiva mobilização ou a presença de células-tronco no tecido lesado. Stokman et al., demonstraram em experimento de IRA por isquemia-reperfusão que a administração de G-CSF teve efeito protetor sobre a função renal. Utilizando células-tronco hematopoiéticas de camundongos transgênicos machos marcadas com flurosceína e transplantadas em fêmeas estes autores não conseguiram demonstrar o aumento da migração destas células para os túbulos lesados no grupo G-CSF. Apesar da melhora da função renal, foi encontrado maior deposição de macrófagos nos grupos tratados com G-CSF(49). Estes resultados sugerem que outros mecanismos podem estar envolvidos no efeito benéfico do tratamento com G-CSF. Nishida et al., em excelente revisão, aponta diversas ações para o fator G-CSF: modulação da ação de neutrófilos, estímulo a migração e proliferação de células endoteliais, efeito direto do G-CSF sobre as células tubulares e efeito modulador sobre as células T além da

já discutida mobilização de células-tronco hematopoiéticas(40). O efeito sobre a modulação de neutrófilos é reconhecido como uma provável ação para o G-CSF. Esse fator estimula o aumento tanto de granulócitos quanto de macrófagos que podem desempenhar papel deletério sob a função renal. Togel et al.(47), demonstraram efeitos deletérios em seu modelo de IRA (isquemia-reperfusão) com a administração de G-CSF atribuídas a granulocitose. Stokman et al.(49), entretanto, no mesmo modelo de isquemia-reperfusão não encontraram aumento de granulócitos nos rins lesados. Esses autores obtiveram aumento dos granulócitos séricos que, entretanto, expressavam menos L-selectina e iguais concentrações de interleucina-1 β . Assim, apesar do aumento dos granulócitos sua cinética inflamatória estava alterada devido a redução da migração para o tecido lesado. A “rolagem” dos neutrófilos do endotélio para a área agredida estava diminuída em função da redução de L-selectina. Da mesma forma não foram encontrados aumento de citocinas inflamatórias apesar da granulocitose. Em conclusão devemos considerar um possível prejuízo na função renal pela granulocitose em alguns modelos(47), entretanto, a alteração da cinética inflamatória, como proposto por Stokman et al.(49), parece contradizer este efeito deletério.

Outro efeito do fator G-CSF é sobre a proliferação e migração de células endoteliais que ocorre através de possíveis receptores específicos ou através

do estímulo para a migração de progenitores endoteliais. Células endoteliais em culturas apresentam crescimento quando adicionadas ao G-CSF sugerindo receptores específicos estimulados pelo fator(96) .

O G-CSF parece também exercer efeito sobre as células tubulares renais com inibição da apoptose. Essa ação, no entanto, não pode ser atribuída como efeito direto do G-CSF já que um receptor específico do fator ainda não foi demonstrado em células tubulares renais. A inibição da apoptose com o uso de G-CSF foi estudado em células do miocárdio. Harada et al., demonstraram que estas células exibem receptores de G-CSF. Sua ligação leva a ativação de sinais de transdução da família Janus quinase-2 (Jak-STAT) resultando em propriedades anti-apoptóticas nos cardiomiócitos e conseqüente redução da área de infarto(97). Assim, especulamos que uma possível ação, por mecanismos semelhantes, possa ocorrer em células tubulares renais.

E por fim, o fator G-CSF também exerce ações reguladoras no sistema imune através de ação sobre células T e dendríticas. O G-CSF pode alterar o padrão de secreção de citocinas dos linfócitos T estimulando a diferenciação na população Th2. Também pode estimular a diferenciação de células T reguladoras e células dendríticas com características de tolerância(98). Diversos estudos, com doenças auto-imunes, como lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla e doença inflamatória intestinal tem sido

testados com o fator G-CSF devido as propriedades citadas. Em conclusão, diversos mecanismos além da migração direta de células-tronco endógenas, podem ser responsáveis pela ação do G-CSF tendo ele possíveis ações anti-apoptóticas e de regulação no sistema imune (Figura 24).

Apesar dos diversos mecanismos de ação, creditamos no presente trabalho, a ação do granulopoiese na mobilização de células-tronco adultas. Esta conclusão esta embasada nos resultados da análise de imunohistoquímica o que não descarta, no entanto, que outras ações possam ocorrer de forma simultânea explicando o benefício do tratamento com G-CSF.

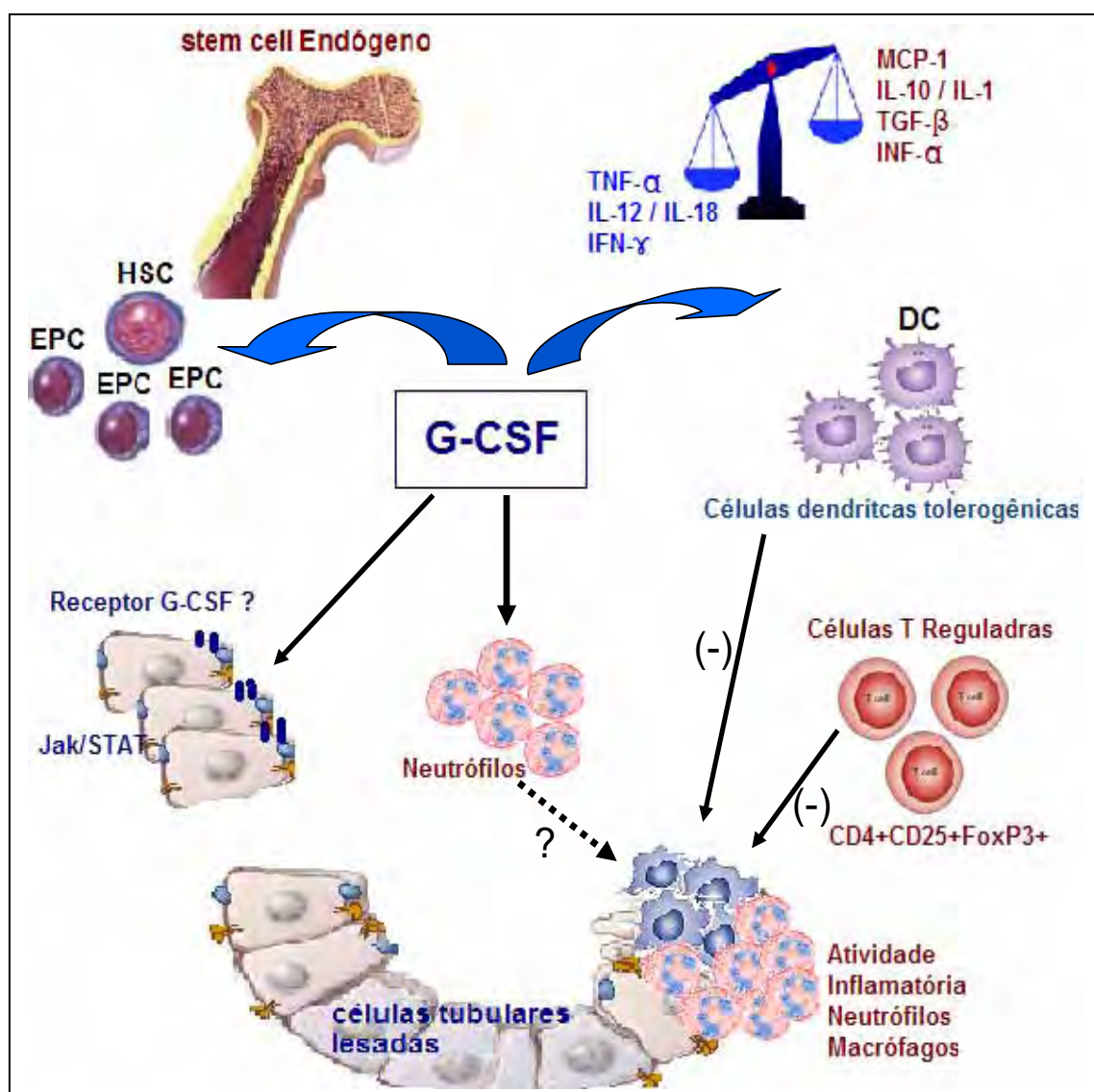


Figura 24. Mecanismo de Ação do G-CSF. O fator G-CSF estimula as células-tronco endógenas para a mobilização de precursores hematopoiéticos (HSC) e células progenitoras endoteliais (EPC). Outra possível ação é o estímulo direto do fator sobre as células tubulares inibindo a apoptose. Seu efeito regulador sobre o sistema imune é observado pela produção de citocinas de padrão anti-inflamatório (balança) de forma mais intensa do que citocinas inflamatórias favorecendo a formação de células reguladoras. O fator também estimula a diferenciação de células dendríticas tolerogênicas e células T com padrão regulador (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) reduzindo a atividade inflamatória. O recrutamento de granulócitos induzido pelo fator pode ter efeito deletério aumentando a inflamação, porém devido a menor expressão de L-selectina a presença de neutrófilos nos tecidos lesados pode não estar aumentada.

Outras Ações dos Fatores de Tropismo: Eritropoetina

Para a eritropoetina tem sido demonstrado que sua ação ocorre pela mobilização de progenitores endoteliais(56) e até mesmo de linhagens mesenquimais(87). Suas ações, no entanto, incluem uma vasta gama de efeitos citoprotetores incluindo o reparo do sistema vascular por progenitores endoteliais até efeitos diretos do hormônio pela inibição da apoptose de células tubulares. Vesey et al., demonstraram que a administração de EPO à células tubulares em cultura promoveu redução no número de apoptose celular induzida pela hipóxia (1% de O₂) de maneira dose dependente. Estes mesmos autores mostraram no modelo de isquemia-reperfusão em ratos que a EPO promoveu semelhante ação também in vivo(99). Esses resultados sugerem efeito direto da EPO na inibição da apoptose celular. Os efeitos na inibição da apoptose são atribuídos a ligação da EPO a receptores específicos para a Eritropoetina (EPO-r). Estes receptores foram encontrados em tecidos neurais, nos endotélios e nos epitélios dos túbulos renais(100). Fishbane et al., mostraram proteção de células tubulares e do mesangio pela EPO e pela darbepoetina a vários graus de insulto (tóxicos e hipóxia). Esta proteção ocorreu através da ligação com receptores de eritropoetina específicos. Um análogo de EPO que não se liga ao seu receptor (EPO-r) não apresentou efeito

benéfico sugerindo participação do receptor de EPO na inibição da apoptose celular(101).

A ligação do receptor EPO-r com a eritropoetina leva a ativação da via da Janus quinase-2 e conseqüente ativação de numerosas vias intracelulares de sinalização. Estas vias incluem a via do fator de transcrição 5 (STAT5), ativação da proteína mitogênica ativada (MAPK) e da fosfoinositol quinase-3 (PI3K)/Akt. Estas três vias exercem efeitos anti-apoptóticos pela inibição da FOXO3a, inativação de glicoproteína quinase-3 β , redução da atividade de proteínas pró-apoptóticas (Bad, Bax) e aumento da atividade das proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_l). Outras ações incluem a inativação de caspases 3, 8 e 9, manutenção do potencial de membrana das mitocôndrias e preservação da síntese de ATP. O fator NK-k β é ativado pela via Akt e tem sido implicado no efeito protetor da EPO. A ativação do NK-k β leva a ativação de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-x_l, XIAP e Gadd45 β). Outra ação do NK-k β ocorre através da inibição do óxido nítrico (NO) e aumento da expressão do fator induzido pela hipóxia (HF-1). O fator HF-1, por sua vez, aumenta a produção de eritropoetina (Figura 25)(102).

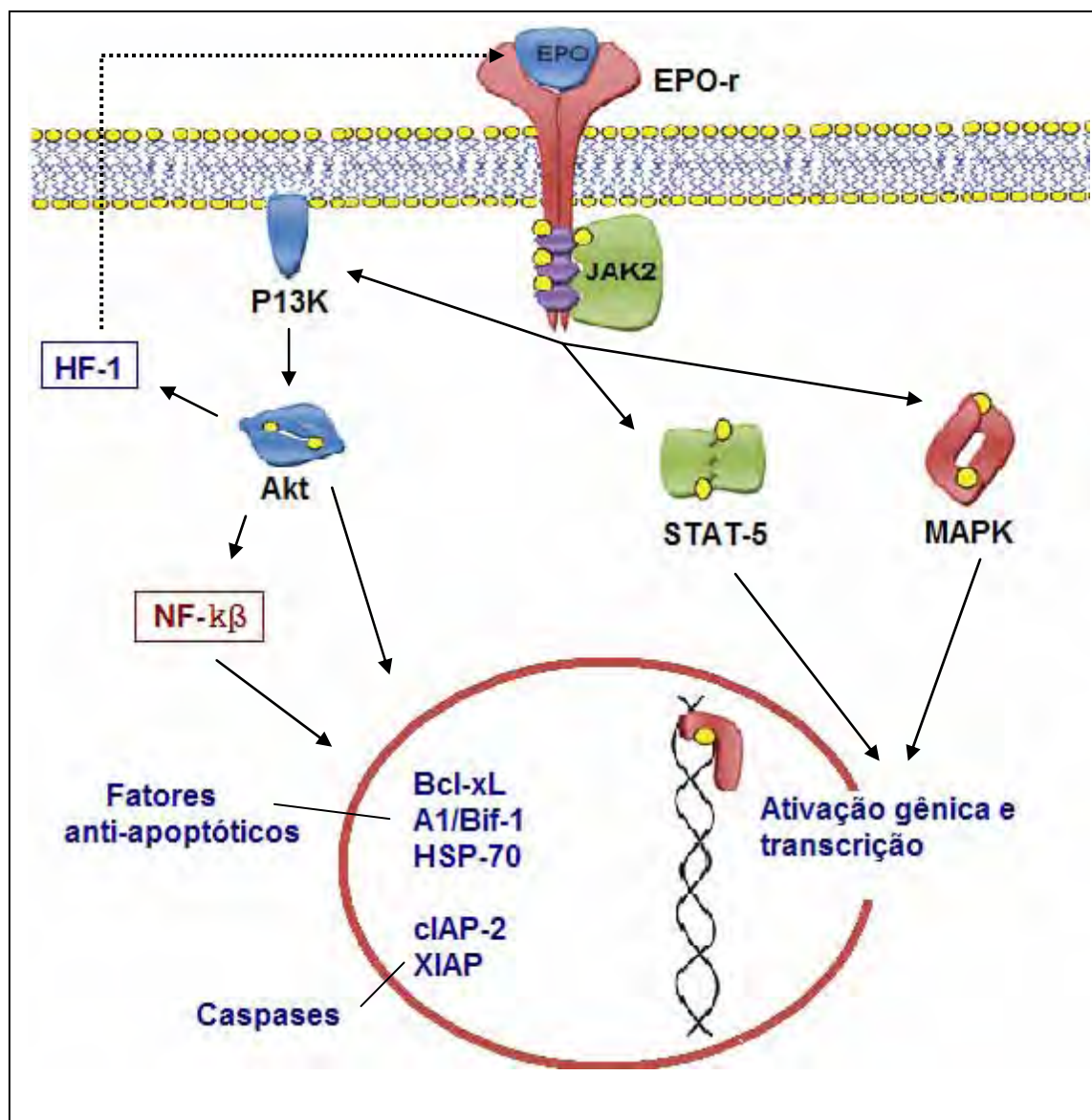


Figura 25. Efeito de citoproteção da Eritropoetina (EPO) através da inibição da apoptose celular pela ativação da Janus quinase 2 (JAK2). A ligação da EPO a seus receptores específicos (EPO-r) leva a fosforilação de resíduos de tirosina da JAK2 intracelulares que por sua vez ativa outras vias de sinalização. Essas vias incluem o sinal de ativação e transcrição 5 (STAT5), proteína miogênica ativada (MAPK) e fosfoinositol quinase 3 (PI3K)/Akt. Estas três vias exercem efeitos de proteção pela ativação de fatores anti-apotóticos (Bcl-xL, A1/Bif-1, HSP-70) e pela inibição de caspases (cIAP-2 e XIAP). A via Akt e NF-κB também estimulam a produção do fator induzido pela hipóxia (HF-1). Esse fator exibe efeito adicional em estimular a produção de EPO (seta pontilhada).

Katavetin et al., em recente revisão sobre a EPO, sugere que o sinal de apoptose celular ocorre em células severamente agredidas como um fator de morte programada antes da necrose celular. Dessa forma, a apoptose funciona como um fator de “morte pacífica” em células irreversivelmente lesadas. Assim, a simples inibição da apoptose não apresenta o efeito citoprotetor esperado porque as células gravemente lesadas não funcionam de forma adequada e eventualmente sofrem necrose. As células necróticas são deletérias por induzir inflamação causando dano adicional. Os autores sugerem que os benefícios da EPO estão além de seus efeitos de inibição da apoptose e deve-se a efeitos antioxidantes. Assim os efeitos antioxidantes produziram citoproteção das células e dessa forma o efeito anti-apoptotico em células pouco lesadas resultaria em benefícios(103).

Os efeitos antioxidantes da EPO tem sido investigados em células em cultura. Sua ação ocorre pelo estímulo da hemo-oxigenase-1 (HO-1) que é uma proteína antioxidante. A EPO exerceu proteção do efeito do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da HO-1 em células endoteliais em cultura. Também foi demonstrado aumento da expressão da atividade da HO-1 por técnica de imunohistoquímica em ratos Dahl sal-sensíveis. Estes animais representam um modelo de doença renal crônica túbulo-intersticial quando mantidos em dietas com baixo teor de sal. Nesse modelo (ratos Dahl e dieta

com baixo teor de sal) a EPO reduziu a proteinúria e o grau de lesão a capilares peritubulares comparados ao controle. Essa nefroproteção foi associada ao efeito da HO-1(104). A hemo-oxigenase-1 também pode ser ativada pela via da PI3K/Akt(105). Essa via intracelular é ativada pela ligação EPO ao seu receptor e conseqüente ação da Janus quinase-2. Esses achados sugerem que a EPO pode aumentar diretamente a produção de HO-1 pela via PI3K/Akt. Outras ações ocorrem pela indução de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

Em resumo, a ação da eritropoetina se dá além do estímulo de migração de células-tronco através de mecanismos diretos de citoproteção. Estes mecanismos não estão completamente elucidados, porém receptores de EPO foram encontrados em células renais favorecendo a hipótese de ação direta da EPO. Sua ação ocorre pela inibição da apoptose celular pela ativação da JAK2/STAT5 e JAK2/PI3K/Akt somadas a um provável efeito antioxidante principalmente pelo aumento da expressão da proteína antioxidante HO-1.

Pelo exposto, a ação da eritropoetina é provavelmente multifatorial, porém creditamos no presente estudo sua ação na mobilização de células-tronco tanto das linhagens progenitora endotelial quanto da mesenquimal. Esta conclusão se apóia nos resultados do estudo de imunohistoquímica.

Para uma investigação ampla dos mecanismos de ação da eritropoetina e do granuloquine se faz necessário outro modelo de estudo. Conseguimos creditar o efeito benéfico de ambos os fatores em estimular a migração de células-tronco no presente trabalho. Ressalta-se, mais uma vez, que outros mecanismos de ação podem agir de maneira aditiva.

Conclusão

No modelo experimental de nefropatia por adriamicina em camundongos, a administração de granuloquine ou eritropoetina concomitante à agressão atenua a lesão renal.

O fator G-CSF é hoje usado, além de sua ação clássica, no tratamento de lesões cardíacas isquêmicas e insuficiência renal aguda com resultados promissores. Não foi ainda claramente demonstrado seu papel no tratamento da lesão renal crônica. Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar proteção histológica do fator G-CSF num modelo de insuficiência renal crônica.

A eritropoetina também tem sido usada além de sua função clássica em estimular a eritropoiese no tratamento da insuficiência renal aguda já em ensaios clínicos randomizados em pacientes em alto risco de IRA. Nossos dados confirmam o resultado de outros pesquisadores que a EPO também parece exercer proteção em modelos de IRC. Não encontramos efeitos aditivos dos dois tratamentos combinados (EPO + granuloquine).

Creditamos a ação benéfica destes fatores, em estimular o tropismo de células-tronco da medula para o rim. Embasa esta teoria a análise de imunohistoquímica que revelou aumento da expressão de progenitores

hematopoiéticos e endoteliais no tratamento com granuloquine e aumento da expressão de progenitores hematopoiéticos, endoteliais e mesenquimais no tratamento com eritropoetina. Os progenitores hematopoiéticos e endoteliais correlacionaram-se com a melhora da histologia mais do que os progenitores mesenquimais. É possível que a eritropoetina e o granuloquine tenham efeito também no microambiente extra-medula em nichos de células-tronco adultas que se encontram em diferentes compartimentos do rim. Outros efeitos específicos diferentes do estímulo a proliferação e diferenciação de células-tronco tais como inibição da apoptose, modulação da resposta imunológica e ação antioxidante também podem contribuir para a proteção obtida nos grupos tratados. Estes efeitos podem atuar de forma sinérgica à migração de células-tronco.

Os resultados positivos obtidos na histologia encorajam o uso da eritropoetina e do granuloquine como alternativas de tratamento para a doença renal crônica. Julgamos necessários estudos adicionais para investigação de seu mecanismo de ação, bem como dose e tempo de administração.

Referências

- (1) Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 2007 Nov 7;298(17):2038-47.
- (2) Cusumano AM, Gonzalez Bedat MC. Chronic kidney disease in Latin America: time to improve screening and detection. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008 Mar;3(2):594-600.
- (3) Mazza NM, Riella MC. Raising awareness of chronic kidney disease in a Brazilian urban population. *Braz J Med Biol Res* 2009 Aug;42(8):750-5.
- (4) Lugon JR. End-stage renal disease and chronic kidney disease in Brazil. *Ethn Dis* 2009;19(1 Suppl 1):S1-S9.
- (5) Mastroianni-Kirsztajn G, Bastos MG, Burdmann EA. Strategies of the Brazilian Chronic Kidney Disease Prevention Campaign (2003-2009). *Nephron Clin Pract* 2010 Sep 17;117(3):c259-c265.

-
- (6) Cusumano A, Garcia-Garcia G, Di GC, Hermida O, Lavorato C, Carreno CA, et al. End-stage renal disease and its treatment in Latin America in the twenty-first century. *Ren Fail* 2006;28(8):631-7.
- (7) Angert D, Houser SR. Stem cell therapy for heart failure. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2009 Aug;11(4):316-27.
- (8) George JC. Stem cell therapy in acute myocardial infarction: a review of clinical trials. *Transl Res* 2010 Jan;155(1):10-9.
- (9) Vidaltamayo R, Bargas J, Covarrubias L, Hernandez A, Galarraga E, Gutierrez-Ospina G, et al. STEM CELL THERAPY FOR PARKINSON'S DISEASE: A ROAD MAP FOR A SUCCESSFUL FUTURE. *Stem Cells Dev* 2009 Aug 28.
- (10) Mollura DJ, Hare JM, Rabb H. Stem-cell therapy for renal diseases. *Am J Kidney Dis* 2003 Nov;42(5):891-905.
- (11) Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarasah S, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 2001 Sep;195(2):229-35.

-
- (12) Ikarashi K, Li B, Suwa M, Kawamura K, Morioka T, Yao J, et al. Bone marrow cells contribute to regeneration of damaged glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 2005 May;67(5):1925-33.
- (13) Masuya M, Drake CJ, Fleming PA, Reilly CM, Zeng H, Hill WD, et al. Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. *Blood* 2003 Mar 15;101(6):2215-8.
- (14) Hishikawa K, Fujita T. Stem cells and kidney disease. *Hypertens Res* 2006 Oct;29(10):745-9.
- (15) Chhabra P, Brayman KL. The use of stem cells in kidney disease. *Curr Opin Organ Transplant* 2009 Feb;14(1):72-8.
- (16) Yamamoto M, Cui L, Johkura K, Asanuma K, Okouchi Y, Ogiwara N, et al. Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 Jan;290(1):F52-F60.
- (17) Forbes SJ, Vig P, Poulsom R, Wright NA, Alison MR. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin Sci (Lond)* 2002 Oct;103(4):355-69.

-
- (18) Sagrinati C, Ronconi E, Lazzeri E, Lasagni L, Romagnani P. Stem-cell approaches for kidney repair: choosing the right cells. *Trends Mol Med* 2008 Jul;14(7):277-85.
- (19) Gupta S, Rosenberg ME. Do stem cells exist in the adult kidney? *Am J Nephrol* 2008;28(4):607-13.
- (20) Dekel B, Zangi L, Shezen E, Reich-Zeliger S, Eventov-Friedman S, Katchman H, et al. Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin- multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 2006 Dec;17(12):3300-14.
- (21) Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2006 Sep;17(9):2443-56.
- (22) Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001 May 4;105(3):369-77.

-
- (23) Noronha IL, Cavaglieri RC, Ramalho RJ. Células-tronco e doenças renais. In: Cruz J, Cruz HMM, Kirsztajn GM, Barros RT, editors. *Atualidades em nefrologia* 11. Savier; 2010. p. 46-55.
- (24) Bussolati B, Tetta C, Camussi G. Contribution of stem cells to kidney repair. *Am J Nephrol* 2008;28(5):813-22.
- (25) Goligorsky MS, Kuo MC, Patschan D, Verhaar MC. Review article: endothelial progenitor cells in renal disease. *Nephrology (Carlton)* 2009 Apr;14(3):291-7.
- (26) Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 Jul 1;23(7):1185-9.
- (27) Lin KK, Goodell MA. Hematopoietic Stem Cells from Bone Marrow: Purification and Function Analysis. In: Lanza R, Klimanskaya I, editors. *Essential Stem Cell Methods*. 1 ed. Elsevier; 2009. p. 237-48.
- (28) Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003 Jun;9(6):702-12.

-
- (29) Uchimura H, Marumo T, Takase O, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, et al. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2005 Apr;16(4):997-1004.
- (30) Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, Couser WG, Shankland SJ, et al. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2003 May;14(5):1188-99.
- (31) Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004 Jul;15(7):1794-804.
- (32) Mao JJ, Marion NW. Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells. In: Lanza R, Klimanskaya I, editors. *Essential Stem Cell Methods*. 1 ed. Elsevier; 2009. p. 297-318.
- (33) Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of

- acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med* 2004 Dec;14(6):1035-41.
- (34) Humphreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Annu Rev Med* 2008;59:311-25.
- (35) McTaggart SJ, Atkinson K. Mesenchymal stem cells: immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2007 Feb;12(1):44-52.
- (36) Choi S, Park M, Kim J, Hwang S, Park S, Lee Y. The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of the chronic renal failure. *Stem Cells Dev* 2008 Jul 22.
- (37) Magnasco A, Corselli M, Bertelli R, Ibatici A, Peresi M, Gaggero G, et al. Mesenchymal stem cells protective effect in adriamycin model of nephropathy. *Cell Transplant* 2008;17(10-11):1157-67.
- (38) Imai N, Kaur T, Rosenberg ME, Gupta S. Cellular therapy of kidney diseases. *Semin Dial* 2009 Nov;22(6):629-35.
- (39) Hopkins C, Li J, Rae F, Little MH. Stem cell options for kidney disease. *J Pathol* 2009 Jan;217(2):265-81.

-
- (40) Nishida M, Hamaoka K. How does G-CSF act on the kidney during acute tubular injury? *Nephron Exp Nephrol* 2006;104(4):e123-e128.
- (41) Kastrup J, Ripa RS, Wang Y, Jorgensen E. Myocardial regeneration induced by granulocyte-colony-stimulating factor mobilization of stem cells in patients with acute or chronic ischaemic heart disease: a non-invasive alternative for clinical stem cell therapy? *Eur Heart J* 2006 Dec;27(23):2748-54.
- (42) Takano H, Qin Y, Hasegawa H, Ueda K, Niitsuma Y, Ohtsuka M, et al. Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med* 2006 Mar;84(3):185-93.
- (43) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Ohtsu Y, Ishida M, Yutani C, et al. G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. *Cell Transplant* 2004;13(7-8):741-8.
- (44) Fang TC, Alison MR, Cook HT, Jeffery R, Wright NA, Poulsom R. Proliferation of bone marrow-derived cells contributes to regeneration after folic acid-induced acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol* 2005 Jun;16(6):1723-32.

-
- (45) Iwasaki M, Adachi Y, Minamino K, Suzuki Y, Zhang Y, Okigaki M, et al. Mobilization of bone marrow cells by G-CSF rescues mice from cisplatin-induced renal failure, and M-CSF enhances the effects of G-CSF. *J Am Soc Nephrol* 2005 Mar;16(3):658-66.
- (46) Nishida M, Fujimoto S, Toiyama K, Sato H, Hamaoka K. Effect of hematopoietic cytokines on renal function in cisplatin-induced ARF in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Nov 5;324(1):341-7.
- (47) Togel F, Isaac J, Westenfelder C. Hematopoietic stem cell mobilization-associated granulocytosis severely worsens acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004 May;15(5):1261-7.
- (48) Zhang Y, Woodward VK, Shelton JM, Richardson JA, Zhou XJ, Link D, et al. Ischemia-reperfusion induces G-CSF gene expression by renal medullary thick ascending limb cells in vivo and in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 Jun;286(6):F1193-F1201.
- (49) Stokman G, Leemans JC, Claessen N, Weening JJ, Florquin S. Hematopoietic stem cell mobilization therapy accelerates recovery of renal function independent of stem cell contribution. *J Am Soc Nephrol* 2005 Jun;16(6):1684-92.

- (50) Stokman G, Leemans JC, Stroo I, Hoedemaeker I, Claessen N, Teske GJ, et al. Enhanced mobilization of bone marrow cells does not ameliorate renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2008 Feb;23(2):483-91.
- (51) Steward WP, Scarffe JH. Clinical trials with haemopoietic growth factors. *Prog Growth Factor Res* 1989;1(1):1-12.
- (52) Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Feb;25(2):296-301.
- (53) Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992 Apr;72(2):449-89.
- (54) Sharples EJ, Thiemermann C, Yaqoob MM. Novel applications of recombinant erythropoietin. *Curr Opin Pharmacol* 2006 Apr;6(2):184-9.
- (55) Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Philipe H, Sheaff M, et al. Erythropoietin protects the kidney against the injury and

- dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2004 Aug;15(8):2115-24.
- (56) Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003 Aug 15;102(4):1340-6.
- (57) Imamura R, Moriyama T, Isaka Y, Namba Y, Ichimaru N, Takahara S, et al. Erythropoietin protects the kidneys against ischemia reperfusion injury by activating hypoxia inducible factor-1alpha. *Transplantation* 2007 May 27;83(10):1371-9.
- (58) Kapoor S. Beneficial effects of erythropoietin in ischemia-reperfusion injury. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008 Sep;52(8):1167-8.
- (59) Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, et al. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J* 2003 Sep;17(12):1754-5.
- (60) Bagnis C, Beaufils H, Jacquiaud C, Adabra Y, Jouanneau C, Le NG, et al. Erythropoietin enhances recovery after cisplatin-induced acute

- renal failure in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 2001 May;16(5):932-8.
- (61) Yalcin S, Muftuoglu S, Cetin E, Sarer B, Yildirim BA, Zeybek D, et al. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by recombinant human erythropoietin. *Med Oncol* 2003;20(2):169-74.
- (62) Kim KH, Oudit GY, Backx PH. Erythropoietin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2008 Jan;324(1):160-9.
- (63) Chen X, Chen Y, Bi Y, Fu N, Shan C, Wang S, et al. Preventive cardioprotection of erythropoietin against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007 Oct;21(5):367-74.
- (64) Hamed S, Barshack I, Luboshits G, Wexler D, Deutsch V, Keren G, et al. Erythropoietin improves myocardial performance in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2006 Aug;27(15):1876-83.
- (65) Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, et al. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in

- doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation* 2006 Jan 31;113(4):535-43.
- (66) Noiri E, Nagano N, Negishi K, Doi K, Miyata S, Abe M, et al. Efficacy of darbepoetin in doxorubicin-induced cardiorenal injury in rats. *Nephron Exp Nephrol* 2006;104(1):e6-e14.
- (67) Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009 Jun;75(11):1145-52.
- (68) Shimamura T, Morrison AB. A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am J Pathol* 1975 Apr;79(1):95-106.
- (69) Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, Fujimi S, Fujishima M. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int* 1986 Feb;29(2):502-10.
- (70) Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 1982 Jan;46(1):16-23.

- (71) Bertani T, Cutillo F, Zoja C, Broggin M, Remuzzi G. Tubulointerstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney Int* 1986 Oct;30(4):488-96.
- (72) Bertani T, Rocchi G, Sacchi G, Mecca G, Remuzzi G. Adriamycin-induced glomerulosclerosis in the rat. *Am J Kidney Dis* 1986 Jan;7(1):12-9.
- (73) O'Donnell MP, Michels L, Kasiske B, Raij L, Keane WF. Adriamycin-induced chronic proteinuria: a structural and functional study. *J Lab Clin Med* 1985 Jul;106(1):62-7.
- (74) Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int* 2000 Oct;58(4):1797-804.
- (75) Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, et al. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 1994 Aug 1;84(3):691-701.
- (76) Watt SM, Gilmore DJ, Davis JM, Clark MR, Waldmann H. Cell-surface markers on haemopoietic precursors. Reagents for the

- isolation and analysis of progenitor cell subpopulations. *Mol Cell Probes* 1987 Dec;1(4):297-326.
- (77) Spangrude GJ, Brooks DM. Mouse strain variability in the expression of the hematopoietic stem cell antigen Ly-6A/E by bone marrow cells. *Blood* 1993 Dec 1;82(11):3327-32.
- (78) van de RM, Heimfeld S, Spangrude GJ, Weissman IL. Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Jun;86(12):4634-8.
- (79) Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, et al. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res* 2008 Apr 1;14(7):1931-7.
- (80) Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003 Jun;17(9):984-92.
- (81) Pierelli L, Bonanno G, Rutella S, Marone M, Scambia G, Leone G. CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells. *Leuk Lymphoma* 2001 Nov;42(6):1195-206.

- (82) Keppler A, Gretz N, Schmidt R, Kloetzer HM, Groene HJ, Lelongt B, et al. Plasma creatinine determination in mice and rats: an enzymatic method compares favorably with a high-performance liquid chromatography assay. *Kidney Int* 2007 Jan;71(1):74-8.
- (83) Zhang JJ, Yi ZW, Dang XQ, He XJ, Wu XC. [Mobilization effects of SCF along with G-CSF on bone marrow stem cells and endothelial progenitor cells in rats with unilateral ureteral obstruction]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2007 Apr;9(2):144-8.
- (84) Song YR, Lee T, You SJ, Chin HJ, Chae DW, Lim C, et al. Prevention of acute kidney injury by erythropoietin in patients undergoing coronary artery bypass grafting: a pilot study. *Am J Nephrol* 2009;30(3):253-60.
- (85) Bahlmann FH, Song R, Boehm SM, Mengel M, von WR, Lindschau C, et al. Low-dose therapy with the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alpha persistently activates endothelial Akt and attenuates progressive organ failure. *Circulation* 2004 Aug 24;110(8):1006-12.
- (86) Kang DH, Park EY, Yu ES, Lee YS, Yoon KI. Renoprotective effect of erythropoietin (EPO): possibly via an amelioration of renal hypoxia

- with stimulation of angiogenesis in the kidney. *Kidney Int* 2005 May;67(5):1683.
- (87) Bi B, Guo J, Marlier A, Lin SR, Cantley LG. Erythropoietin expands a stromal cell population that can mediate renoprotection. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 Oct;295(4):F1017-F1022.
- (88) Hohenstein B, Kuo MC, Addabbo F, Yasuda K, Ratliff B, Schwarzenberger C, et al. Enhanced progenitor cell recruitment and endothelial repair after selective endothelial injury of the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010 Jun;298(6):F1504-F1514.
- (89) Semedo P, Correa-Costa M, Antonio CM, Maria Avancini Costa MD, ntonia dos RM, 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 Dec;27(12):3063-73.
- (90) 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. *Transplant Proc* 2009 Apr;41(3):947-51.

- (91) Li B, Cohen A, Hudson TE, Motlagh D, Amrani DL, Duffield JS. Mobilized human hematopoietic stem/progenitor cells promote kidney repair after ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2010 May 25;121(20):2211-20.
- (92) Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003 Dec;14(12):3138-46.
- (93) Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* 2004 Sep;114(6):795-804.
- (94) Lee PT, 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 Cells* 2010 Mar 31;28(3):573-84.
- (95) Nadasdy T, Laszik Z, Blick KE, Johnson LD, Silva FG. Proliferative activity of intrinsic cell populations in the normal human kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994 Jun;4(12):2032-9.
- (96) Bocchietto E, Guglielmetti A, Silvagno F, Taraboletti G, Pescarmona GP, Mantovani A, et al. Proliferative and migratory responses of

- murine microvascular endothelial cells to granulocyte-colony-stimulating factor. *J Cell Physiol* 1993 Apr;155(1):89-95.
- (97) Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 2005 Mar;11(3):305-11.
- (98) Rutella S, Zavala F, Danese S, Kared H, Leone G. Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol* 2005 Dec 1;175(11):7085-91.
- (99) Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobe G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2004 Feb;19(2):348-55.
- (100) Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int* 1999 Mar;55(3):808-20.
- (101) Fishbane S, Ragolia L, Palaia T, Johnson B, Elzein H, Maesaka JK. Cytoprotection by darbepoetin/epoetin alfa in pig tubular and mouse mesangial cells. *Kidney Int* 2004 Feb;65(2):452-8.

-
- (102) Johnson DW, Forman C, Vesey DA. Novel renoprotective actions of erythropoietin: new uses for an old hormone. *Nephrology (Carlton)* 2006 Aug;11(4):306-12.
- (103) Katavetin P, Tungsanga K, Eiam-Ong S, Nangaku M. Antioxidative effects of erythropoietin. *Kidney Int Suppl* 2007 Nov;(107):S10-S15.
- (104) Katavetin P, Inagi R, Miyata T, Shao J, Sassa R, Adler S, et al. Erythropoietin induces heme oxygenase-1 expression and attenuates oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 Aug 10;359(4):928-34.
- (105) Calo LA, Davis PA, Piccoli A, Pessina AC. A role for heme oxygenase-1 in the antioxidant and antiapoptotic effects of erythropoietin: the start of a good news/bad news story? *Nephron Physiol* 2006;103(3):107-11.