

Cristianne da Silva Alexandre

As células linhagem negativa (Lin⁻) de medula
óssea atenuam a progressão da doença renal
crônica

São Paulo

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cristianne da Silva Alexandre

As células linhagem negativa (Lin⁻) de medula
óssea atenuam a progressão da doença renal
crônica

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Nefrologia

Orientadora: Dra Lúcia Andrade

São Paulo

2007

Esse trabalho foi realizado no LIM 12 da Faculdade de
Medicina da USP, com suporte da FAPESP projeto
05/56056-8 e CNPq.

Agradecimientos

Agradecimento a Deus

Ah! Senhor Javé, fostes vós que fizestes o céu e a terra com a força de vosso braço. Nada vos é impossível.

Jeremias 32,17

Agradecimento à família

À minha mãe que me ensinou a trilhar o caminho do estudo e do conhecimento desde cedo e teve coragem e paciência para manter-se longe de mim por longos, mas agora finitos, treze anos enquanto eu completava a primeira fase de minha vida acadêmica.

À minha irmã que sempre enxergou adiante e acreditou que com determinação e luta é possível se chegar aos objetivos, por mais distantes que eles pareçam estar.

Ao meu esposo que no dia-a-dia tem me ensinado que nada há de tão definitivo e intransponível que não possa ser contornado.

Ao meu querido sobrinho que chegou para renovar a essência da vida entre nós e me ensinou que na simplicidade das pequenas coisas, se esconde a alegria, a paz e a auto-realização.

Aos cunhados, sogros, tios, tias e primos que mesmo à distância sempre torceram e rezaram por mim.

Agradecimento aos amigos

Há amigos que são mais afeiçoados que irmãos.

Agradeço àqueles que não vejo há anos e que se despediram de mim quando estava indo para faculdade, certos de que tudo passaria logo e em breve nos reencontraríamos.

Agradeço àqueles que encontrei na universidade, em dias tão difíceis, e até hoje caminhamos juntos e somos verdadeiros irmãos, como Karina e Luiz e aos que aqui encontrei como Ana Carolina.

Agradecimento ao Lim 12

Sem dúvida aqui não teria chegado se não tivesse encontrado pessoas maravilhosas no LIM 12 que me ajudaram tecnicamente, mas também pessoalmente. Ao Dr Seguro agradeço as idéias brilhantes e constantes e o ensinamento sobre a dedicação à pesquisa.

Apreendi com a Helô que é possível conciliar trabalho com alegria e serenidade, aprendi com a Talita que as coisas não são tão ruins como parecem e que é sempre possível ajudar alguém mesmo quando se está mergulhado em um mar de trabalho. Apreendi com o Rildo a generosidade de ajudar a quem mal se conhece.

Ao meu amigo especial Nivaldo agradeço cada elogio nos dias em que nada parecia dar certo.

Não posso esquecer a Ciça, a Eloá, a Carolzinha e a Fabíola que contribuem para a organização do laboratório.

Agradecimento à orientadora

Lembro como se fosse hoje o primeiro dia em que fui passar visita no serviço de Agudos da residência médica. Não conhecia sequer uma ala do hospital e ela ao perceber isso viu todos os pacientes prontamente comigo, apesar de ter outras obrigações a fazer. Naquele dia eu pensei que se um dia tivesse a oportunidade de estar em um serviço de ensino seria como ela. Os anos se passaram e ao decidir quem seria minha orientadora de pós-graduação, achei que seguiria outros caminhos, mas lá estava eu de novo ingressando no mundo da pesquisa experimental sob os cuidados da Dra Lúcia. Mais do que uma orientadora que nunca cansou de me dizer o que fazer ou até fazer comigo, de ler pacientemente o que eu escrevia e principalmente de tolerar toda a minha teimosia, ela se tornou uma verdadeira mãe. Mãe no sentido mais nobre da palavra: no sentido da compreensão, da paciência, do cuidar, do educar e principalmente de dar asas para cada um seguir o seu próprio caminho.

Sumário

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1 Definição de stem cells	2
1.2 Stem cells: localização, subgrupos e diferenciação	3
1.3 Stem cells de medula óssea e tecido renal	4
1.4 Stem cells em tecido renal.....	6
1.5 Stem cells em modelo de Insuficiência Renal Aguda (IRA)	7
1.6 Stem cells em modelo de Insuficiência Renal Crônica (IRC).....	10
2. Objetivo.....	12
3. Materiais e Métodos.....	14
3.1. Expansão de colônia e triagem de animais:	15
3.2. Separação de células linhagem negativa (Lin ⁻):.....	15
3.3. Injeção de células Lin ⁻ :.....	17
3.4. Divisão dos grupos:.....	17
3.5. Parâmetros de avaliação:.....	19
3.5.1 Estudos de função renal e análise bioquímica:	19
3.5.2 Análise histomorfométrica.....	21
3.5.3 Análise imunohistoquímica.....	23
3.5.4 Análise da expressão de proteínas envolvidas no processo de inflamação e regeneração	24
3.6. Análise estatística:.....	27
4. Resultados	28

4.1 Proteinúria (mg/24hs):	29
4.2 Pressão arterial (mmhg):	30
4.3 Clearance de inulina (ml/min/100g):	31
4.4. Aldosterona plasmática (ng/dl):	32
4.5 Hematócrito (%):.....	33
4.6. Peso corpóreo (g):	34
4.7. Mortalidade (%):	35
4.8. Índice de glomeruloesclerose (%):.....	35
4.9. Área intersticial relativa (%):	36
4.10. Imunohistoquímica para ED-1 (macrófagos):.....	39
4.11. Imunohistoquímica para CD3 (linfócitos T):.....	42
4.12. Imunohistoquímica para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular):	44
4.13. Western blotting para MCP-1 (proteína quimiotática de macrófagos):	46
4.14. Western blotting para VEGF (fator de crescimento endotelial vascular):	48
4.15. Área glomerular:	50
4.16. Western blotting para p21:	51
4.17. Western blotting para eNOS (óxido nítrico sintetase endotelial):	53
5. Discussão	55
6. Conclusões	64
7. Referências Bibliográficas	66
Anexos	79

Resumo

ALEXANDRE;C.S. - **As células linhagem negativa (Lin⁻) de medula óssea atenuam a progressão da doença renal crônica.** São Paulo, 2007. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Introdução: A doença renal crônica continua sendo um desafio no campo da pesquisa médica. Atualmente um interesse crescente tem surgido no intuito de avaliar o potencial de células tronco em retardar o avanço de doenças crônicas progressivas. **Material e Métodos:** Para determinar o efeito dessas células em um modelo de progressão de doença renal crônica foram usadas células linhagem negativa (Lin⁻) separadas magneticamente e injetadas em ratos submetidos à injúria renal. Ratos singênicos Fischer 344 foram submetidos à nefrectomia 5/6 (Nx) e divididos em 3 grupos: Nx (não tratados); NxSC1 (submetidos à infusão de 2×10^6 células Lin⁻ no 15º dia de pós-operatório); e NxSC3 (submetidos à infusão de 2×10^6 células Lin⁻ no 15º, 30º e 45º dias de pós-operatório). No 60º dia de pós-operatório clearance de inulina, imunohistoquímica e immunoblotting foram realizados. **Resultados:** Os animais submetidos à nefrectomia apresentaram redução do clearance de inulina ($0,33 \pm 0,02$ ml/min/100g peso corpóreo), proteinúria ($12 \pm 0,5$ mg/24hs), anemia e hipertensão ($145 \pm 7,7$ mmHg) compatíveis com doença renal crônica. A infusão de células Lin⁻ resultou em atenuação da proteinúria ($p < 0,05$) com relação aos animais não tratados a despeito de não ter havido diferença nos níveis de pressão arterial e aldosterona plasmática. Esses achados foram similares entre os grupos tratados com uma ou com três infusões de células. Adicionalmente a infusão de células resultou em redução do índice de glomeruloesclerose e da área intersticial

relativa ($p < 0,05$), menor infiltração do tecido renal por macrófagos e linfócitos e menor proliferação celular. A expressão tecidual do p21 e de VEGF já foi associada à aceleração da progressão da lesão renal crônica. No nosso modelo ambas as proteínas tiveram sua expressão reduzida. A redução da expressão tecidual de eNOS tem sido implicada na progressão da doença renal. Em nosso modelo houve aumento dessa expressão após infusão das células **Conclusões:** A infusão de células Lin⁻ atenuou todos os marcadores de injúria renal em um modelo de doença precoce possivelmente através de um mecanismo imunomodulador.

Descritores: 1. Insuficiência renal crônica 2. Células tronco 3. Ratos endogâmicos F344 4. Macrófagos 5. Linfócitos 6. Proteínas proto-oncogênicas p21 7. Fator de crescimento do endotélio vascular 8. Óxido nítrico sintase

Summary

ALEXANDRE;C.S. – **Lineage negative bone marrow cells attenuate the progression of chronic renal failure.** São Paulo, 2007. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Progressive renal failure continues to be a challenge. The use of bone marrow-derived stem cells (SCs) represents a means of meeting that challenge. We used lineage-negative (Lin^-) SCs to test the hypothesis that Lin^- cell infusion decreases renal injury. Syngeneic Fischer 344 rats were submitted to 5/6 nephrectomy and divided into 3 groups: Nx (untreated); NxSC1 (receiving 2×10^6 Lin^- cells on postnephrectomy day 15); and NxSC3 (receiving 2×10^6 Lin^- cells on postnephrectomy days 15, 30 and 45). Controls were unoperated/untreated. On postnephrectomy day 60, clearance studies, immunohistochemistry and immunoblotting were performed. Lin^- cell infusion effectively reduced postnephrectomy proteinuria, glomerulosclerosis, anemia, renal infiltration of immune cells and monocyte chemoattractant protein-1 protein expression, as well as decreasing the interstitial area. Immunostaining for proliferating cell nuclear antigen showed that, in comparison with controls, Nx rats presented greater cell proliferation, whereas NxSC1 rats and NxSC3 rats presented less cell proliferation than did Nx rats. Protein expression of p21 and VEGF increased after nephrectomy and decreased after Lin^- cell infusion. Protein expression of eNOS reduced after nephrectomy and increased after cell infusion. These data suggest that SC treatment ameliorates progressive end-stage renal disease.

Keywords: 1. Renal insufficiency chronic 2. Stem cells 3. Rats, Inbred F344 4. Macrophages 5. Lymphocytes 6. Proto-oncogene proteins p21 (ras) 7. Vascular endothelial growth factor 8. Nitric oxide synthase

1. Introdução

Nos últimos anos um interesse crescente vem sendo observado no que diz respeito à pesquisa relacionada às *stem cells* (células tronco), levando ao desenvolvimento de um novo campo de conhecimento: a medicina regenerativa.(1) Esse campo baseia-se no potencial uso terapêutico dessas células nas diversas áreas médicas dada a sua possível capacidade de reconstituir órgãos *in vitro* para transplante, substituir células em órgãos lesados ou oferecer genes para suprir determinados defeitos enzimáticos.

1.1 Definição de stem cells

São definidas como *stem cells* aquelas células capazes de se diferenciar em linhagens celulares especializadas, porém se auto regenerando em cada ciclo de divisão celular para manter o pool de células tronco.(2) São classicamente divididas em dois grandes grupos: stem cells embrionárias (ESC) e stem cells adultas ou somáticas (ASC), dependendo da sua origem ser tecido embrionário ou tecido adulto (medula óssea, cérebro), respectivamente.

As *stem cells* embrionárias podem formar qualquer tecido embrionário e tecidos extra-embrionários (placenta), se diferenciando, portanto, em células das três linhagens germinativas: ectodérmica, mesodérmica e endodérmica. Caracterizam-se assim como células totipotentes. As ASC são derivadas de tecidos ou órgãos já desenvolvidos e portanto não têm a capacidade de gerar tecido extra-embrionário. Algumas delas são pluripotentes, gerando células das três linhagens referidas acima, enquanto outras são multipotentes, diferenciando-se em tipos

celulares de uma ou duas dessas linhagens. As principais fontes dessas células adultas são: medula óssea, cérebro, fígado e pâncreas.

Além das características definidoras citadas acima, as *stem cells* se caracterizam por apresentarem ciclo celular lento, capacidade de proliferação *in vitro* e localização em nichos específicos com acesso a suprimento sanguíneo e interação com células próprias daqueles tecidos que previnem um aumento na velocidade do ciclo celular.(1) Apesar dessa capacidade de diferenciação, as *stem cells* não devem ser consideradas células não diferenciadas uma vez que apresentam marcadores celulares específicos como é o caso do CD34 e CD117 nas *stem cells* hematopoiéticas, CD133 em *stem cells* neurais, dentre outras.

1.2 Stem cells: localização, subgrupos e diferenciação

Evidências têm se acumulado da presença de *stem cells* em vários tecidos. Alguns exemplos incluem a medula óssea, tecido nervoso, mucosa gastrintestinal, fígado e pâncreas. (3-6). Inicialmente essas células foram identificadas em tecidos de alto *turnover* celular, sendo atualmente descritas também em tecidos de menor ciclo de regeneração celular. Com relação ao tecido renal sempre houve uma evidência indireta da presença dessas células que é o potencial de regeneração das células tubulares após insultos agudos. Recentemente alguns trabalhos as têm identificado no tecido renal como discutido adiante.

Um grupo específico de *stem cells*, as de medula óssea, tem sido estudado como base da terapia celular para o tecido renal. Existem várias razões para isso. Primeiro, a medula óssea tem habilidades de diferenciação pluripotentes,

segundo, é obtida de tecido adulto poupando todas as discussões éticas relacionadas ao uso de células embrionárias. Além disso, essas células podem ser facilmente retiradas de um doador e uma vez sendo modificadas *in vitro* podem ser facilmente reintroduzidas de forma autóloga.

A medula óssea tem múltiplos tipos de *stem cells*. Os principais grupos são: hematopoiéticas, mesenquimais, células progenitoras adultas multipotentes e as “side population cells” (SPC). A categorização desses subgrupos tem sido dificultada devido à falta de marcadores específicos para cada subpopulação e ao fato de algumas dessas células não seguirem os padrões habituais de diferenciação.

Inicialmente acreditava-se que as *stem cells* hematopoiéticas eram precursoras apenas de células sanguíneas, mas vários trabalhos experimentais demonstraram sua plasticidade em diferenciar-se em células de pele, fígado, pulmão e trato gastrointestinal.(7) As células mesenquimais presentes no estroma de sustentação da medula óssea podem crescer *in vitro* como células aderentes em cultura e gerar osteócitos, condrócitos, adipócitos e células endoteliais. (8) Os dois outros grupos também têm sido relacionados à diferenciação em diversos grupos celulares. (9)

1.3 Stem cells de medula óssea e tecido renal

Alguns dados experimentais merecem ser descritos uma vez que tentaram demonstrar o potencial de diferenciação das células da medula óssea

em células de tecido renal. Em 2001 Poulsom e colaboradores demonstraram que ratas fêmeas irradiadas que receberam transplante de medula óssea de ratos machos formavam células tubulares renais que continham o cromossomo Y do doador. (10) Células contendo esse cromossomo também foram localizadas em glomérulo com morfologia e localização semelhante a de podócitos. No mesmo trabalho foram avaliadas oito biópsias, obtidas por motivos diversos, de tecido renal de homens que receberam rins de mulheres verificando-se células positivas para cromossomo Y por hibridização *in situ*, em endotélio e células epiteliais tubulares. Apesar de não conclusivas essas considerações permitiram supor que células da medula óssea poderiam ser mobilizadas até o parênquima renal e aí se diferenciarem.

Nesse mesmo ano Ito e colaboradores utilizaram um modelo de glomerulonefrite mediada por anticorpo (anti-Thy1) para testar a possibilidade das células da medula óssea contribuírem para o reparo glomerular. Vinte e um dias após o transplante de medula óssea entre ratos machos (doadores) e fêmeas (receptoras), era induzida a glomerulonefrite. As células do doador expressavam a proteína de fluorescência verde (EGFP) características desses ratos transgênicos, e após o sacrifício observou-se que 7-18% das células mesangiais dos receptores expressavam essa proteína, assim como 11-12% de células glomerulares não mesangiais, ratificando o potencial da medula óssea em se diferenciar em células renais.(11)

1.4 Stem cells em tecido renal

Nos últimos anos vários estudos têm identificado a presença de stem cells em tecido renal. Em 2004 Oliver e colaboradores baseando-se no conceito de que estas células apresentam ciclo celular lento e localização em nichos, administraram um pulso do nucleotídeo bromodeoxiuridina (BrdU) aos animais submetidos à isquemia-reperfusão e observaram que durante a fase de reparo celular as células marcadas com BrdU desapareciam rapidamente da papila renal a despeito da ausência de apoptose nesse segmento renal. Além disso observaram que células papilares renais isoladas in vitro apresentavam plasticidade, sugerindo que a papila renal seria um nicho de *stem cells* renais.(12) O fato da papila renal, onde a tensão de O₂ é em torno de 4-20 mmHg, ser o nicho das *stem cells* é compatível com os achados que os microambientes hipóxicos exercem papel no controle da função de *stem cells* órgão-específicas adultas. Tem sido sugerido que a baixa tensão de oxigênio modula a sobrevivência, proliferação e capacidade de diferenciação das *stem cells*.(13;14)

Outros autores analisando marcadores in vitro, como CD 133, têm identificado outros nichos de *stem cells* como sítios peritubulares e região S3 dos túbulos proximais.(15;16)

1.5 Stem cells em modelo de Insuficiência Renal Aguda (IRA)

A capacidade das *stem cells* promoverem regeneração de tecido renal em modelos de IRA tem sido demonstrada em alguns estudos. Em 2002, Gupta e colaboradores (17) analisaram biópsias de dois pacientes homens que receberam rins de mulheres e desenvolveram necrose tubular aguda (NTA), demonstrando a presença de cromossomo Y em células tubulares renais, evento não observado quando foram analisadas duas biópsias de rins de mulheres recebidos por homens, que não tinham desenvolvido NTA, sugerindo que a participação das *stem cells* medulares dependia de um evento de injúria renal. Outros trabalhos se somaram a este, demonstrando que as células da medula óssea poderiam funcionar como reservatórios de células tubulares, mesangiais, podocitárias e endoteliais em situações de injúria.(18-20) Essas demonstrações fizeram crescer o entusiasmo pelo uso de células tronco, especialmente de medula óssea, na terapia de doenças renais.

Em 2003 dois importantes trabalhos foram publicados em modelos de injúria renal por isquemia-reperfusão. Kale e colaboradores utilizaram ratos transgênicos expressando o gene bacteriano *lacZ*, como doadores de medula óssea.(16) Dos fragmentos de medula óssea foram isoladas as linhagens celulares que expressavam o CD117 (marcador de células de medula óssea diferenciadas para linhagem mielóide) sem expressar marcadores de outras linhagens celulares como o CD45R (marcador de linfócitos B), CD3 (marcador de linfócito T), Gr1 (marcador de linhagem granulocítica), Ter-119 (marcador de eritrócitos), e CD11b (marcador de monócitos). Os ratos irradiados recebiam as células por injeção intravenosa e posteriormente eram submetidos a clampeamento dos pedículos renais seguido de

reperfusão. Os autores encontraram menor dano histológico nos ratos transplantados e uma participação das células da medula óssea na constituição de até 20% dos túbulos regenerados. Em um protocolo semelhante, Lin e colaboradores demonstraram a diferenciação de stem cells hematopoiéticas em células tubulares renais. (15)

A aceleração na recuperação da injúria renal não foi, entretanto, alcançada em um modelo de isquemia-reperfusão em que as células da medula óssea do animal foram mobilizadas com o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF): filgrastima. (21) Vários fatores têm sido aventados para explicar esses resultados aparentemente contraditórios. O primeiro deles é que o uso do fator estimulador de granulócitos mobiliza outras células além das *stem cells* que podem ter um efeito deletério nesse modelo. Adicionalmente, o tempo de clampeamento diferiu entre os experimentos o que pode ter levado a uma injúria vascular maior no grupo de maior tempo de clampeamento com dificuldade de migração das células para o tecido renal. Além disso nesse último trabalho foi observada uma granulocitose não verificada em outros estudos que usaram a mesma dose da droga, o que parece ter contribuído para a piora da lesão renal.

Em um modelo de nefrotoxicidade induzida por drogas, Iwasaki e colaboradores demonstraram que a mobilização celular com o G-CSF foi eficaz em reduzir a injúria tecidual, com níveis menores de uréia e creatinina nos ratos tratados. (22) Esses resultados foram semelhantes aos já apresentados previamente por Nishida.(23) A somatória desses resultados gerou o entusiasmo pelo uso de *stem cells* mobilizadas farmacologicamente em modelos de IRA.

Algumas questões ainda permanecem sem resposta na literatura. Uma delas é que tipo de célula tronco seria a que apresentaria os melhores resultados em situações de IRA. Enquanto a maioria dos autores acredita que as *stem cells* hematopoiéticas podem contribuir para o reparo do tecido renal após injúria aguda, alguns estudos apresentam resultados contraditórios. O mais importante destes demonstrou que as *stem cells* hematopoiéticas não foram eficazes em melhorar a recuperação da IRA em um modelo de nefrotoxicidade por cisplatina, diferente do que ocorreu com o uso de *stem cells* mesenquimais.(24)

Uma outra dúvida corrente na literatura é se as *stem cells* contribuem de forma direta para recuperação tecidual através de diferenciação celular ou se outros mecanismos, como a imunomodulação, estariam envolvidos. Apesar dos primeiros trabalhos sugerirem a ocorrência de diferenciação celular, vários autores têm questionado esses achados.(25) Em alguns desses trabalhos não é possível afastar os mecanismos de fusão e em outros o número de células encontrados é tão pequeno que não permite atribuir todas as melhoras obtidas simplesmente ao processo de diferenciação celular.

Um dos trabalhos iniciais mais importantes na linha da imunomodulação foi publicado por Stokman e colaboradores em 2005.(26) Esse grupo demonstrou que a mobilização de células tronco hematopoiéticas por G-CSF resultava em melhora da função renal não devido a um aumento da incorporação de células epiteliais tubulares de medula óssea e sim devido a uma diminuição do influxo de granulócitos ao rim submetido à injúria e a uma modificação da cinética de mediadores inflamatórios.

Em um outro trabalho Tögel e colaboradores injetaram *stem cells* mesenquimais em um modelo de IRA isquêmica e encontraram menores scores de injúria histológica e apoptose nos animais que receberam as células. Os autores concluíram que a melhora da função renal foi primariamente resultado de efeitos parácrinos causando *downregulation* das citocinas inflamatórias e aumento da regulação de citocinas antiinflamatórias como a IL-10.(25)

1.6 Stem cells em modelo de Insuficiência Renal Crônica (IRC)

Se muitas controvérsias ainda existem com relação ao uso de células tronco em protocolos de IRA, maior dificuldade existe na compreensão do papel dessas células em modelos de IRC. Alguns relatos de casos de pacientes portadores de IRC associadas a doenças hematológicas que evoluíram com melhora da lesão após transplante de medula óssea, sugeriam um papel dessas células enxertadas na recuperação da função renal .(27)

Poucos estudos têm sido feitos em modelos de progressão de doença renal. Um dos mais importantes publicado em 2006 (28) demonstrou que a infusão de células de medula óssea diminuía a mortalidade de animais submetidos à nefrectomia unilateral e injeção de anti-Thy-1.1 intra-renal, um modelo clássico de glomerulonefrite progressiva. Essa diminuição da mortalidade esteve associada à melhora da função renal, redução da proteinúria, do índice de esclerose glomerular e da infiltração renal por macrófagos. Entretanto trata-se de um modelo primariamente auto-imune que não representa a etiologia da IRC na maioria dos pacientes.

Uma outra linha de pesquisa tem sido desenvolvida em modelos experimentais de Alport. Nesses estudos tem sido demonstrado que a infusão de células de medula óssea total resulta em melhora da função renal e da esclerose glomerular, enquanto a infusão de células mesenquimais apenas melhora a fibrose intersticial.(29-31)

Em um modelo de nefrectomia 5/6 (ablação renal subtotal), Zerbini e colaboradores por sua vez não obtiveram sucesso na tentativa de retardar a progressão da doença renal utilizando células de medula óssea total.(32) Persistia entretanto a necessidade de se avaliar o potencial uso de grupos específicos de células da medula óssea nesse modelo clássico de insuficiência renal crônica experimental.

2. Objetivo

Avaliar o impacto da utilização de células Lin⁻ obtidas da medula óssea de ratos em um modelo de ablação renal subtotal (nephrectomia 5/6).

3. Materiais e Métodos

Inicialmente a proposta era usar ratas Fisher 344 singênicas como modelo de insuficiência renal crônica, entretanto após 7 meses de ablação renal subtotal, esses animais não apresentavam proteinúria e/ou redução do clearance de inulina compatíveis com doença renal crônica, o que provocou uma mudança no projeto inicial e resultou na utilização de ratos machos Fisher 344 para realização de ablação subtotal.

3.1. Expansão de colônia e triagem de animais:

Três casais de ratos singênicos Fisher 344 provenientes do Biotério do Instituto de Química da USP foram cruzados repetidamente para expansão da colônia de animais. Animais machos com 12-16 semanas foram submetidos à dosagem de uréia plasmática após jejum de 24 horas através de método espectrofotométrico, sendo excluídos aqueles com uréia > 50 mg %. Os animais selecionados foram mantidos em dieta padrão, acesso à água e condições de temperatura e luz semelhantes.

3.2. Separação de células linhagem negativa (Lin⁻):

Foi utilizado um protocolo de depleção celular (ou seleção negativa) através de separação magnética para isolar as células Lin⁻ de medula óssea. Protocolo semelhante já havia sido usado em estudos de separação celular. (24) O

modelo de depleção foi empregado devido à inexistência de anticorpos específicos para marcação de *stem cells* hematopoiéticas de medula óssea para ratos. Amostras celulares retiradas de medula óssea de fêmur e tibia de ratos entre seis e oito semanas de idade foram obtidas de forma asséptica e suspensas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (Sigma Aldrich). Essa suspensão foi então centrifugada a 300g por dez minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensado no mesmo meio de cultura. A essa suspensão de células foram adicionados os seguintes anticorpos: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA, anti-CD68, anti-CD11b e anti-OX43, todos conjugados a FITC (Serotec). A finalidade da adição desses anticorpos foi formar ligação antígeno-anticorpo com as seguintes células da medula óssea: linfócitos T (CD4+ e CD8+), monócitos (CD11b+) linfócitos B (CD45RA+), granulócitos (CD68+) e eritrócitos (OX 43+). Apesar do CD68 ser largamente utilizado para marcação de macrófagos ele também se encontra expresso em granulócitos de sangue periférico de ratos. Esses anticorpos eram incubados por 40 minutos protegidos da luz, a 4° C, em agitação contínua. Após esse período, a suspensão era novamente centrifugada a 4° C por 10 minutos sendo desprezado o sobrenadante com o excesso de anticorpos e feita nova suspensão no meio de cultura. Em seguida foram adicionados os microbeads anti-FITC que se ligam aos anticorpos aderidos aos antígenos. Após 40 minutos de incubação a 4° C, em agitação contínua, a suspensão foi novamente centrifugada com eliminação do sobrenadante para lavagem do excesso de microbeads. A suspensão de células foi então passada três vezes através de uma coluna magnética que prende os microbeads e deixa escoar as células não marcadas por anticorpos, portanto células linhagem negativa (Lin⁻). Esse procedimento era

repetido por três vezes para garantir maior eficiência na separação. A fração final de células era então contada usando a técnica de contagem de células viáveis através do corante vital Tripán Blue (Sigma-Aldrich) na câmara de Neubauer. De acordo com essa metodologia a suspensão de células foi colocada em uma diluição de 1:1000 de azul de Tripán e após um minuto a mistura foi colocada na câmara de Neubauer. As células que não incorporaram o azul de Tripán eram as células viáveis. Após a contagem, as células foram suspensas em solução fisiológica para infusão nos animais.

3.3. Injeção de células Lin⁺:

Após a contagem, 2×10^6 células suspensas em 500 microlitros de solução salina foram injetadas em ratos receptores através da veia caudal.

3.4. Divisão dos grupos:

Os animais foram divididos em quatro grupos:

- GRUPO Sham: Esses ratos foram submetidos à laparotomia ventral sob anestesia com tiopental 50 mg/kg administrado por via intraperitoneal, sem realização de qualquer outro procedimento cirúrgico, e foram usados como grupo controle.

- GRUPO NX: Esses ratos foram submetidos à laparotomia ventral seguindo o mesmo protocolo de anestesia do grupo I, com subsequente nefrectomia D e ligadura de dois ramos da artéria renal E (modelo de ablação renal 5/6). Nos dias 15, 30 e 45 dias após o procedimento receberam solução salina intravenosamente, via veia caudal.
- GRUPO NXSC1: Esses ratos foram submetidos à laparotomia ventral seguindo o mesmo protocolo de anestesia do grupo I, com subsequente nefrectomia D e ligadura de dois ramos da artéria renal E (modelo de ablação renal 5/6). No 15º dia de pós-operatório receberam células Lin⁻ intravenosamente, via veia caudal.
- GRUPO NXSC3: Esses ratos foram submetidos à laparotomia ventral seguindo o mesmo protocolo de anestesia do grupo I, com subsequente nefrectomia D e ligadura de dois ramos da artéria renal E (modelo de ablação renal 5/6). Nos dias 15, 30 e 45 após o procedimento receberam células Lin⁻ intravenosamente, via veia caudal.

Durante sessenta dias todos os ratos foram mantidos sob as mesmas condições ambientais e alimentares.

3.5. Parâmetros de avaliação:

Após 60 dias de pós-operatório os ratos foram submetidos às seguintes avaliações laboratoriais:

3.5.1 Estudos de função renal e análise bioquímica:

3.5.1.1. Proteinúria em 24 horas (mg/24hs):

Os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas com coleta de urina em 24 horas e posterior dosagem da proteína urinária total utilizando o método de vermelho de pirogalol. Foi utilizado o teste Sensiprot da Labtest Diagnóstica®, através do qual a amostra de urina era misturada a um reagente de cor que contém pirogalol. A quantificação da proteinúria foi feita através de método espectrofotométrico a partir da relação entre a absorbância da amostra e da solução padrão (50 mg de proteína/dL).

3.5.1.2. Clearance de inulina (ml/min/100g):

Após a coleta da urina de 24 horas, os ratos foram submetidos à mensuração do clearance de inulina. Os ratos foram anestesiados com tiopental 50 mg/kg e submetidos à cateterização das duas veias jugulares com cateter PE60, da artéria femoral esquerda com cateter PE50 e da bexiga com cateter PE 240. Um priming de inulina (100mg/kg) foi administrado, com posterior infusão constante de

inulina a uma velocidade de 0,04 ml/min. Após trinta minutos era feita a coleta de sangue inicial. A urina era colhida em três períodos de trinta minutos. Ao final desses períodos o sangue do animal era retirado para medir a concentração de inulina final e realizar as demais dosagens plasmáticas. Os plasmas obtidos eram desproteinizados em uma diluição de 1:11 de solução de ácido perclórico a 5% antes da dosagem da inulina por método espectrofotométrico. As urinas coletadas foram diluídas em dois momentos: primeira diluição 1:11 em água destilada e a segunda diluição calculada a partir da concentração de inulina plasmática. A espectrofotometria foi usada para medir as concentrações de inulina. No cálculo da inulina, quer urinária ou plasmática, foi usado um fator de correção encontrado a partir da curva padrão de inulina, obtida por dosagens seriadas de diferentes concentrações de inulina pelo investigador direto do protocolo. O clearance de inulina foi calculado a partir da razão inulina urinária sobre a plasmática. A pressão arterial femoral foi medida no início experimento.

3.5.1.3. Hematócrito:

Para determinação do hematócrito foi usado um tubo capilar de micro-hematócrito (Perfecta, São Paulo), utilizando sangue obtido no início do experimento do clearance de inulina.

3.5.1.4. Aldosterona plasmática:

Foi usada como marcador da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona nesse modelo de insuficiência renal crônica. A dosagem foi realizada através de método de radioimunoensaio com o Kit Coat-Acount Aldosterone (DPC, Los Angeles, EUA) no Laboratório Central do HC-FMUSP.

3.5.2 Análise histomorfométrica

3.5.2.1. Índice de esclerose glomerular:

Os rins obtidos durante o sacrifício foram fixados em meio de *Dubosq*. Após a fixação foram colocados em bloco de parafina e a seguir desparafinados utilizando técnica padrão seqüencial com cortes de 4 μ m de espessura. As lâminas assim obtidas foram coradas com hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson. Nesse modelo de ablação renal, o achado histológico típico é a esclerose glomerular. A extensão do envolvimento renal pela glomeruloesclerose foi avaliada pelo índice de esclerose glomerular (IEG). Esse índice foi calculado a partir da média ponderada dos scores de todos os glomérulos individualmente. Foram avaliados em cada lâmina 50 glomérulos. O seguinte *score* foi usado:

zero – glomérulo sem lesão,

1- lesão afetando 1-10% da área glomerular,

- 2 - lesões que acometem de 11 a 20% da área glomerular
- 3 - lesões que acometem de 21 a 30% da área glomerular,
- 4 - lesões que acometem de 31 a 40% da área glomerular,
- 5 - lesões que acometem de 41-50% da área glomerular,
- 6- lesão afetando 51-60% da área glomerular,
- 7 - lesões que acometem de 61 a 70% da área glomerular
- 8 - lesões que acometem de 71 a 80% da área glomerular,
- 9 - lesões que acometem de 81 a 90% da área glomerular,
- 10 - lesões que acometem de 91-100% da área glomerular

3.5.2.2. Área intersticial relativa:

Cortes de 4 μm de espessura de tecido renal dos animais foram usados para análise do comprometimento túbulo-intersticial. Para o estudo de morfometria, as imagens obtidas pela microscopia ótica foram captadas por meio de vídeo-câmera de luz conectada a um analisador de imagens (Qwin, Leica, Wetzlar, Alemanha). No córtex de cada rim vinte campos foram analisados. As áreas intersticiais eram primeiramente circuladas manualmente. A área intersticial foi medida de forma percentual com relação ao campo óptico, excluindo os glomérulos.

3.5.2.3. Avaliação da área glomerular:

Cortes de 4 μm de espessura de tecido renal dos animais foram usados para análise da área glomerular. Para o estudo de morfometria, as imagens

obtidas pela microscopia ótica foram captadas por meio de vídeo-câmera de luz conectada a um analisador de imagens (Qwin, Leica, Wetzlar, Alemanha). No córtex de cada rim cinquenta glomérulos foram analisados. A área glomerular era circunscrita manualmente e calculada automaticamente através do software. Após obtenção dos dados foi feita média aritmética dos glomérulos medidos.

3.5.3 Análise imunohistoquímica

3.5.3.1. Anticorpos:

Os seguintes anticorpos foram usados: anticorpo IgG1 monoclonal contra antígeno citoplasmático presente em monócitos, macrófagos e células dendríticas (ED1, Bioproducts for Science, Indianópolis, EUA), anticorpo IgG1 monoclonal contra linfócitos T (CD3, clone W3/13HLK, Loughborough, Inglaterra) e anticorpo IgG1 monoclonal contra antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA, Sigma-Aldrich).

3.5.3.2. Infiltração por macrófagos e linfócitos e proliferação celular:

Seções de 4 μm foram incubadas durante uma hora em temperatura ambiente com diluição de 1/50 anticorpos anti-CD3 e *overnight* com 1:1000 anticorpos anti-ED1 e anti-PCNA. O produto dessa reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase e a cor desenvolvida com 3,3'-

diaminobenzidina, incluindo ou não a adição de cloreto de níquel 8% na presença de água oxigenada. A contracoloração foi feita com Methyl Green para ED1 e PCNA ou hematoxilina de Harris para CD3. Controles negativos foram obtidos pela colocação de anticorpo primário com IgG de camundongo numa concentração equivalente. Para avaliação dos resultados foram avaliados 30 campos ópticos as três marcações, e em seguida determinado o número médio de células por área do campo analisada (0,245 mm²). Apenas para ED1 foi feita a contagem do número de células marcadas por glomérulo, sendo avaliados 50 glomérulos em cada lâmina.

3.5.4 Análise da expressão de proteínas envolvidas no processo de inflamação e regeneração

Algumas proteínas já anteriormente relacionadas à progressão da insuficiência renal crônica em modelos experimentais foram analisadas.

3.5.4.1. Extração de proteínas:

Os rins foram homogeneizados em uma solução gelada (200mM Mannitol, 80mM HEPES, 41mM KOH; pH 7.5) contendo inibidores de proteases (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) usando um pistilo de teflon (Schmidt and Co., Frankfurt/M, Germany). O homogeneizado foi então centrifugado (2000 g) por 15 min a 4°C para remoção das

células e debris celulares. A medida da concentração da proteína foi feita pelo método colorimétrico de Bradford.

3.5.4.2. Eletroforese e immunoblotting:

As amostras de proteína correram em minigéis de poliacrilamida. Após a transferência por eletroeluição para a membrana de nitrocelulose, os blots foram tratados com leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T por 1 hora e incubados com os respectivos anticorpos. A marcação foi feita através da peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (anti-rabbit 1:2000, anti-mouse 1:2000 ou anti-goat 1:10000, Sigma) usando sistema de quimiluminescência (ECL, Amersham). A normatização foi feita com a hibridização novamente das membranas com a actina (Sigma-Aldrich).

3.5.4.3. Semi-quantificação da proteína:

As bandas nos filmes de ECL foram submetidas ao *scan* Image Master VDS (Pharmacia Biotech), onde foi feita a densitometria. Estas bandas foram normatizadas pela densitometria da proteína actina. As seguintes proteínas foram analisadas:

- ✓ **p21** - A expressão dessa proteína foi avaliada no intuito de identificar regulações gênicas induzidas pela infusão de *stem cells*. As amostras, em uma concentração de 10 microgramas/linha, correram em minigel

a 12% durante uma hora e dez minutos. A hibridização com anti-p21 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology) em TBS-T foi feita overnight a 4° em agitação contínua. Após a hibridização a membrana foi lavada 4 vezes por cinco minutos cada e feita hibridização com anticorpo secundário anti-rabbit 1:2000. Após esse procedimento a membrana era exposta aos reagentes de detecção ECL (Amershan) e a imagem era revelada.

- ✓ **VEGF (fator de crescimento endotelial):** A expressão dessa proteína foi avaliada no intuito de identificar mecanismos parácrinos após infusão de *stem cells*. As amostras, em uma concentração de 20 microgramas/linha, correram em minigel a 12% durante uma hora e dez minutos. A hibridização com anti-VEGF 1:500 (Santa Cruz Biotechnology) em TBS-T foi feita overnight a 4° em agitação contínua. Após a hibridização a membrana foi lavada 4 vezes por cinco minutos cada e feita hibridização com anticorpo secundário anti-mouse 1:2000. Após esse procedimento a membrana era exposta aos reagentes de detecção ECL (Amershan) e a imagem era revelada.
- ✓ **MCP-1 (proteína quimiotática de macrófagos):** As amostras, em uma concentração de 20 microgramas/linha correram em minigel a 15% durante uma hora e vinte minutos. A hibridização com anti-MCP1 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology) em TBS-T foi feita overnight em temperatura ambiente em agitação contínua. Após a hibridização a membrana foi lavada 4 vezes por cinco minutos cada e feita hibridização com anticorpo secundário anti-goat 1:10000. Após

esse procedimento a membrana era exposta aos reagentes de detecção ECL (Amershan) e a imagem era revelada.

- ✓ **eNOS (óxido nítrico sintetase endotelial):** As amostras, em uma concentração de 40 microgramas/linha, correram em minigel a 8% durante uma hora e quarenta minutos. A hibridização com anti-eNOS 1:500 (Santa Cruz Biotechnology) em TBS-T foi feita overnight em temperatura ambiente em agitação contínua. Após a hibridização a membrana foi lavada 4 vezes por cinco minutos cada e feita hibridização com anticorpo secundário anti-mouse 1:2000. Após esse procedimento a membrana era exposta aos reagentes de detecção ECL (Amershan) e a imagem era revelada.

3.6. Análise estatística:

Os dados estão expressos em média \pm erro padrão.

Diferenças entre as médias dos múltiplos parâmetros foram analisadas pelo método One-Way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. O programa estatístico utilizado foi o GraphPrism 3.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. Resultados

4.1 Proteinúria (mg/24hs):

Na tabela 1 observamos que os ratos submetidos à nefrectomia apresentaram um aumento significativo da proteinúria, o que demonstra a injúria glomerular desses animais (NX= $12,04 \pm 0,53$ p<0,001 vs Sham, NXSC1= $8,74 \pm 1,13$ p<0,01 vs Sham, NXSC3= $8,11 \pm 0,96$ mg/24 hs p<0,05 vs sham). Os animais tratados apresentaram diminuição da proteinúria com relação aos animais não tratados (NX= $12,04 \pm 0,53$ p<0,05 vs NXSC1 e NXSC3) (Figura 1).

Tabela 1. Clearance inulina, pressão arterial média (PAM), aldosterona sérica, proteinúria de 24 horas e hematócrito no 60º dia de pós-operatório:

	Clearance de inulina (mL/min/100 g)	PAM (mmHg)	Aldosterona sérica (ng/dL)	Proteinúria (mg/24 h)	Hematócrito(%)
Sham	$0,69 \pm 0,04^a$	$115 \pm 2,6^b$	$8,27 \pm 0,6^a$	$4,43 \pm 0,7$	$51,38 \pm 0,9$
NX	$0,33 \pm 0,02$	$145 \pm 7,7$	$102,3 \pm 14,5$	$12,04 \pm 0,5^{c,d}$	$42,71 \pm 2,5^g$
NXSC1	$0,35 \pm 0,05$	$144 \pm 4,6$	$105,3 \pm 17,6$	$8,74 \pm 1,1^e$	$47,38 \pm 2,2$
NXSC3	$0,33 \pm 0,04$	$139 \pm 7,5$	$104,1 \pm 17,8$	$8,10 \pm 1,0^f$	$49,71 \pm 1,9$

Dados expressos em média \pm EPM.

^ap < 0,001 vs. todos os grupos; ^bp < 0,01 vs. todos os grupos; ^cp < 0,001 vs. Sham; ^dp < 0,05 vs. NXSC1 e NXSC3; ^ep < 0,01 vs. Sham; ^fp < 0,05 vs. Sham; ^gp < 0,05 vs. Sham e NXSC3

Excreção urinária de proteínas

(mg/24h)

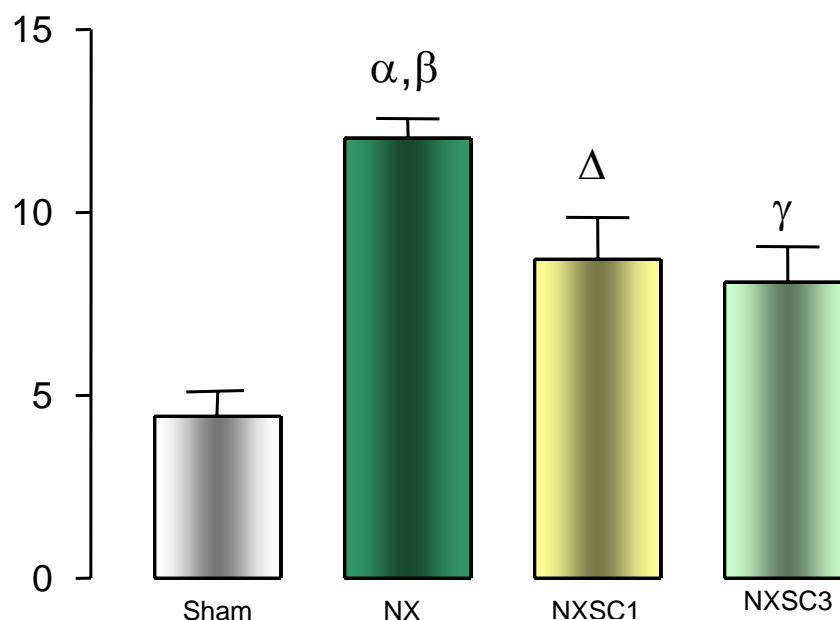


Figura 1. Gráfico da excreção urinária de proteínas em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório. α $p < 0,001$ vs. ,Sham; β $p < 0,05$ vs. NXSC1 and NXSC3, Δ $p < 0,01$ vs. Sham, γ $p < 0,05$ vs. Sham.

4.2 Pressão arterial (mmhg):

Conforme observado na tabela 1, os animais nefrectomizados apresentaram níveis pressóricos mais elevados que os animais não nefrectomizados (NX= $145 \pm 7,68$ vs Sham= $115 \pm 2,58$ mmHg, $p < 0,01$), achado compatível com o estabelecimento da doença renal progressiva. Não houve diferença nos níveis pressóricos entre os animais que receberam e os que não receberam infusões de células Lin⁻ (NX= $145 \pm 7,68$ vs NXSC1= $144 \pm 4,64$ e NXSC3= $139 \pm 7,47$ mmHg, $p > 0,05$) (Figura 2)

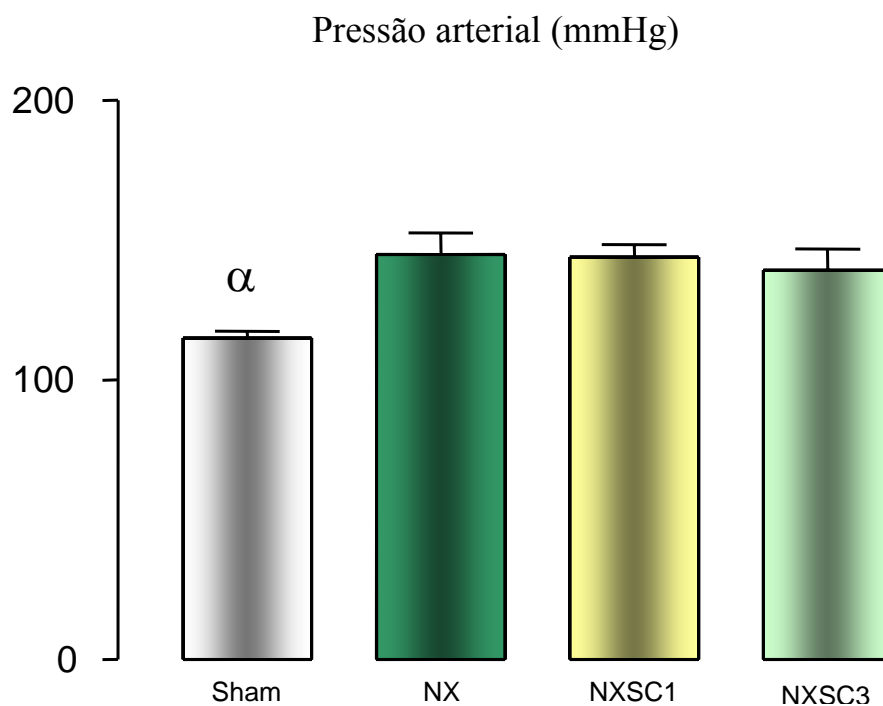


Figura 2. Gráfico da pressão arterial em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório. ^αp < 0,01 vs. todos os grupos.

4.3 Clearance de inulina (ml/min/100g):

Os animais submetidos à nefrectomia apresentaram redução do clearance de inulina demonstrando a eficiência do procedimento cirúrgico (Sham= $0,69 \pm 0,04$ vs NX= $0,33 \pm 0,02$ e NXSC1= $0,35 \pm 0,05$ e NXSC3= $0,33 \pm 0,04$ ml/min/100g, $p < 0,001$). Não foi observada diferença significativa entre os animais que receberam ou não as células Lin⁻. (Ver Tabela 1 e Figura 3)

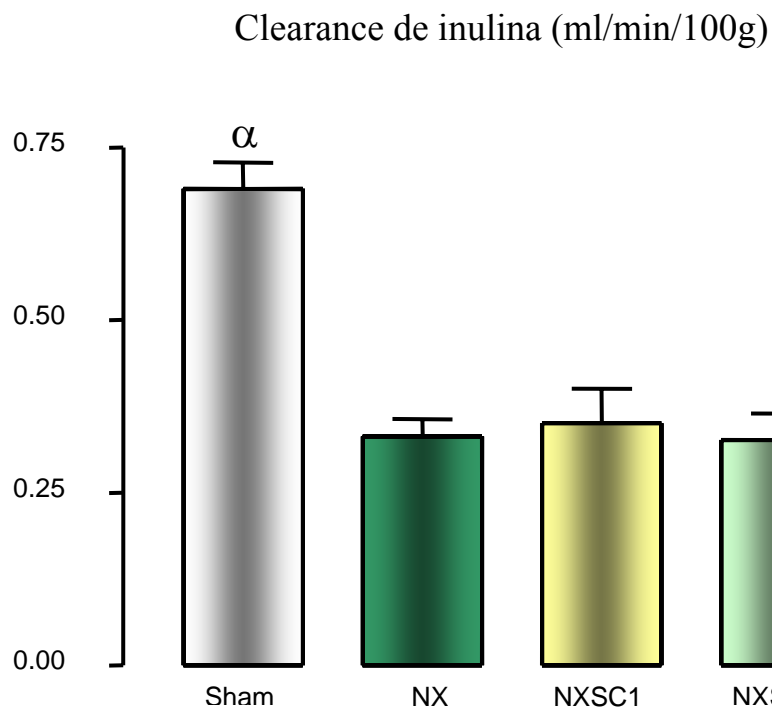


Figura 3. Gráfico do clearance de inulina em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório. ^αp < 0,001 vs. todos os grupos

4.4. Aldosterona plasmática (ng/dl):

Os níveis plasmáticos de aldosterona encontraram-se elevados nos grupos de animais nefrectomizados, NX = 102,3 ± 14,48; NXSC1 = 105,3 ± 17,56; NXSC3 = 104,1 ± 17,82 ng/dL em comparação com o grupo Sham = 8,3 ± 0,62 (p < 0,001). (Tabela 1, Figura 4). Não houve diferenças entre os animais que receberam as células Lin⁻ e os que não receberam.

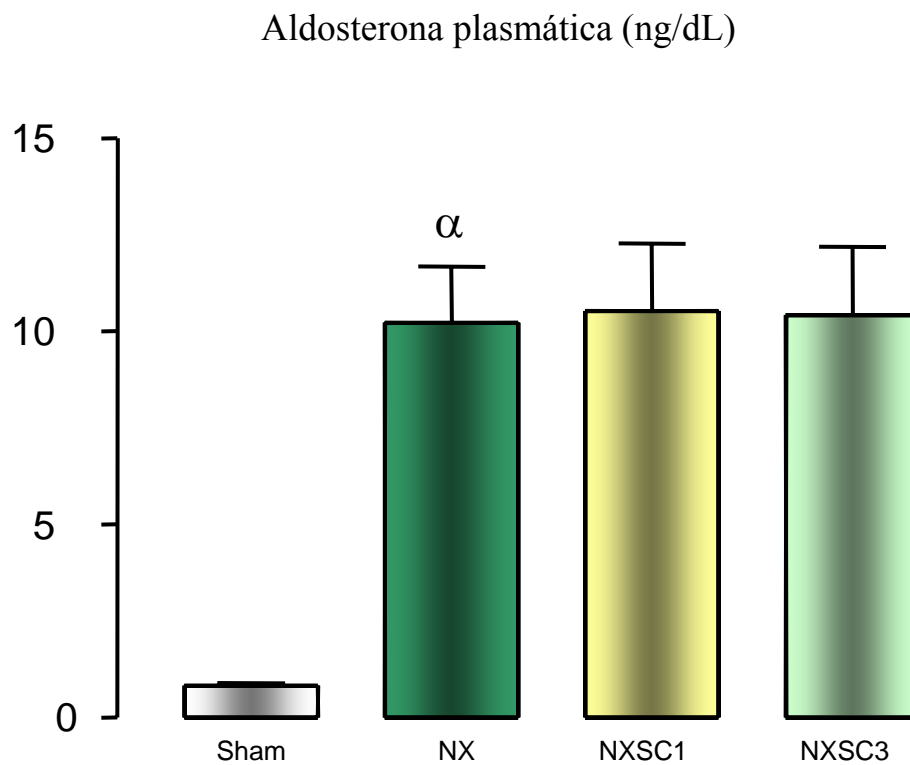


Figura 4. Gráfico da concentração de aldosterona plasmática em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório. ^ap < 0,001 vs. todos os grupos.

4.5 Hematócrito (%):

Os animais que foram submetidos à ablação renal subtotal e não receberam a infusão de células apresentaram os menores níveis de hematócrito provavelmente secundário à insuficiência renal (NX = 42,71 ± 2,48 %, p < 0,05 vs Sham e NXSC3). Os animais que receberam células Lin⁻ apresentaram tendência à recuperação dos níveis de hematócrito (NXSC1 = 47,38 ± 2,17 e NXSC3 = 49,71 ± 1,87 %, p > 0,05 vs Sham). (Ver Tabela 1, Figura 5)

Hematócrito (%)

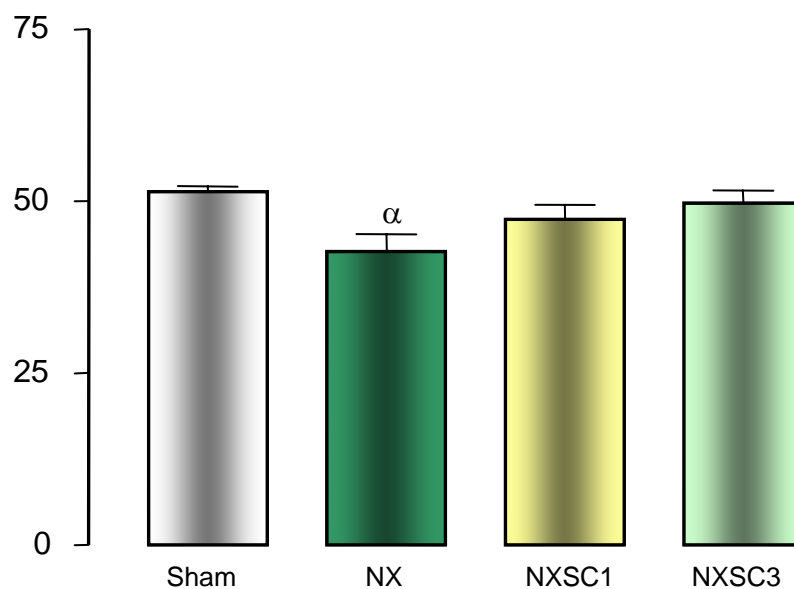


Figura 5. Gráfico do nível de hematócrito em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório. α $p < 0,05$ versus Sham e NXSC3.

4.6. Peso corpóreo (g):

Os animais submetidos à nefrectomia apresentaram menor ganho de peso corpóreo com relação aos animais não operados, embora não haja diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Delta (Δ) de peso corpóreo ao longo dos 60 dias de estudo:

	Delta de peso (g)
Sham	64,38 \pm 7,70
NX	36,88 \pm 6,54
NXSC1	45,63 \pm 8,32
NXSC3	46,88 \pm 5,67

4.7. Mortalidade (%):

Não houve análise estatística da mortalidade. A mortalidade natural foi de 15% no grupo Sham, 33% no grupo NX e 30% e 34% nos grupos NXSC1 e NXSC3 respectivamente.

4.8. Índice de glomeruloesclerose (%):

Os animais nefrectomizados apresentaram maior esclerose glomerular que os animais não operados (Sham = 3,63 \pm 0,86; NX = 125,60 \pm 15,76, $p < 0,001$). A infusão de células Lin⁻ resultou em diminuição do índice de glomeruloesclerose independente do número de injeções recebidas. (NX = 125,60 \pm 15,76; NXSC1 = 61,50 \pm 11,48; NXSC3 = 62,93 \pm 11,24); (NX vs NXSC1 e NXSC3, $p < 0,001$). (Figuras 6 e 7)

4.9. Área intersticial relativa (%):

A área intersticial relativa foi maior nos animais NX = $16,53 \pm 1,27$ %, com uma significativa redução nos grupos NXSC1 ($p < 0,001$) e NXSC3 ($p < 0,01$). Não há diferença entre os dois últimos grupos (NXSC1 = $11,38 \pm 1,58$ % ; NXSC3 = $11,33 \pm 1,94$ % , $p > 0,05$). (Figuras 8 e 9)

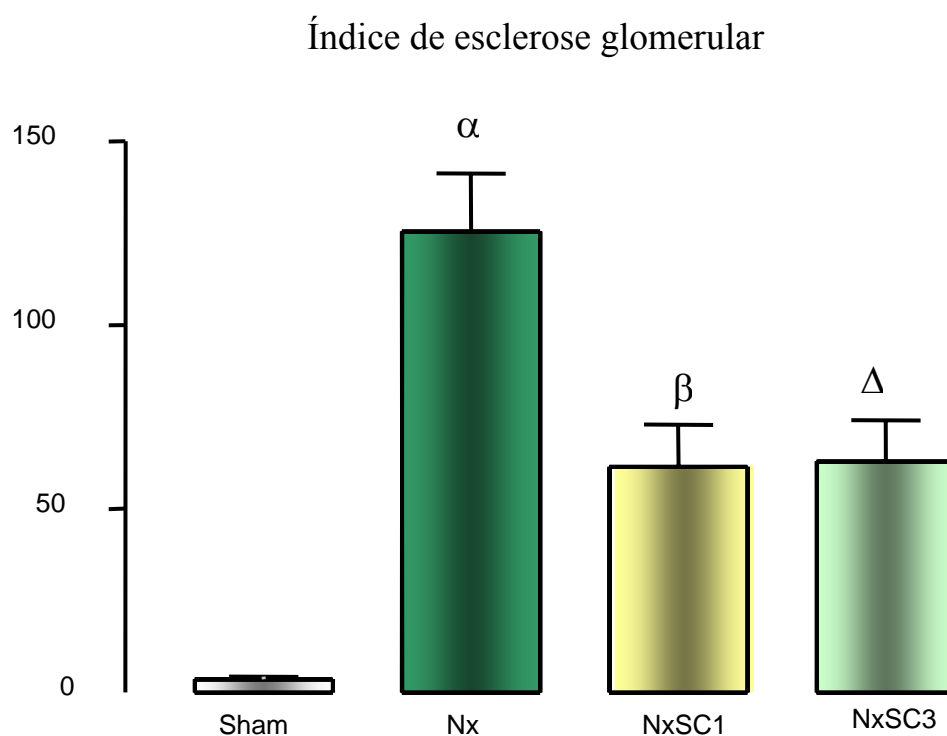


Figura 6. Gráfico do índice de esclerose glomerular em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório. $\alpha p < 0,001$ vs. todos os grupos $p < 0,001$ vs todos os grupos, $\beta p < 0,001$ vs Sham e $\Delta p < 0,01$ vs Sham

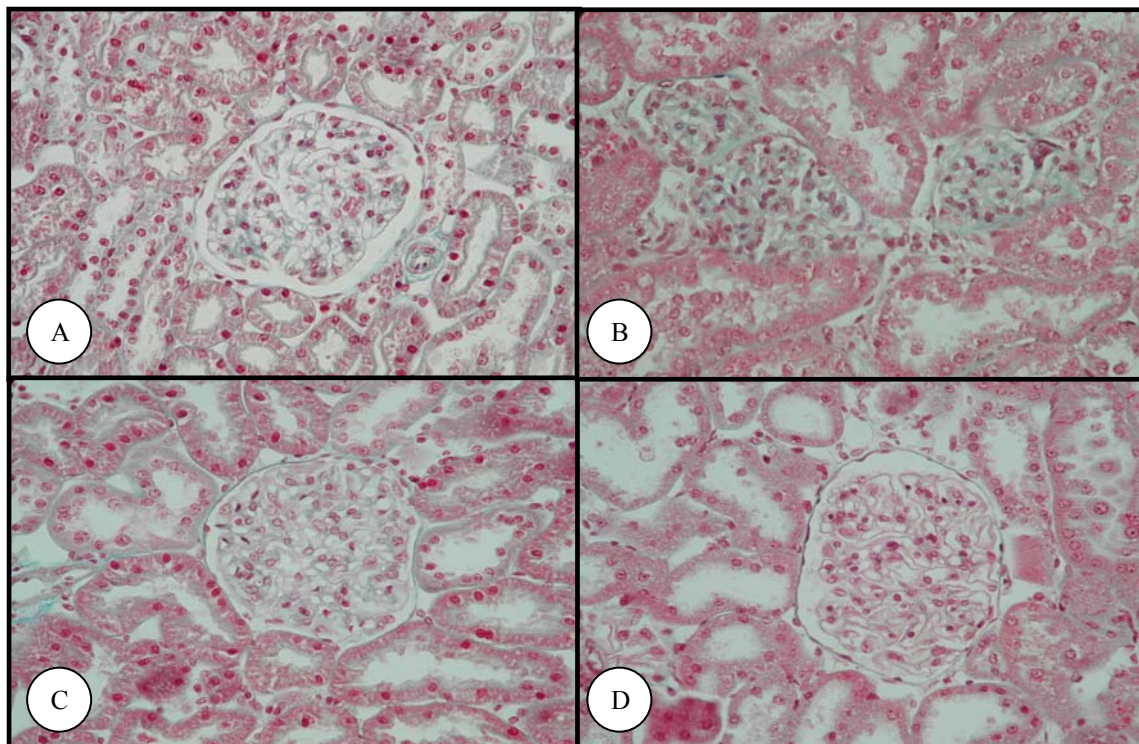


Figura 7. Fotos representativas do índice de esclerose glomerular nos animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60^o dia de pós-operatório: (A) rato controle, (B) rato 5/6 sem células Lin- (C) rato 5/6 com infusão células no 15^o dia pós-operatório e (D) rato 5/6 com infusão células no 15^o, 30^o e 45^o dias pós-operatório.

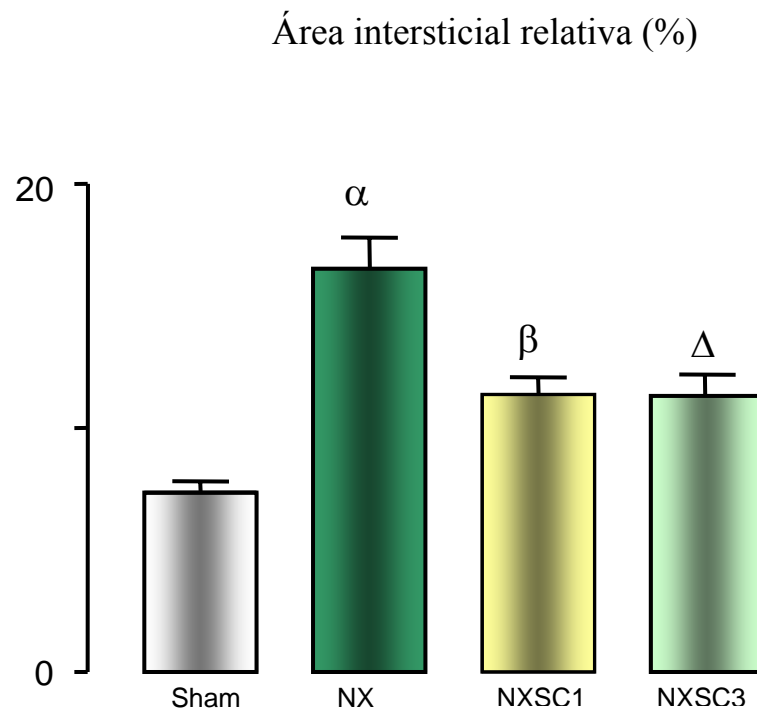


Figura 8. Gráfico da área intersticial relativa em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório. α $p < 0,001$ vs Sham e NXSC1, β $p < 0,05$ vs Sham e Δ $p < 0,01$ vs Sham e NX.

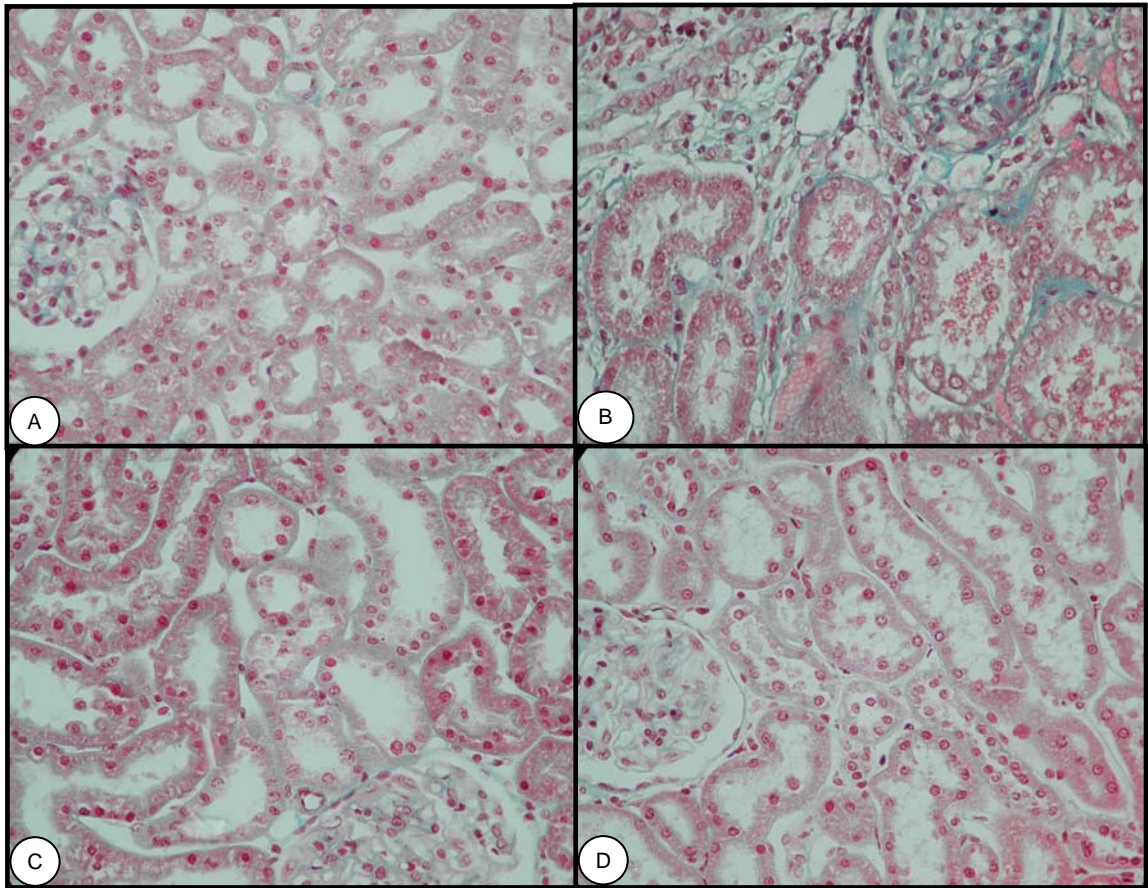


Figura 9: Fotos representativas do área intersticial relativa nos animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório (A) rato controle, (B) rato 5/6 sem células Lin (C) rato 5/6 com infusão células no 15º dia pós-operatório e (D) rato 5/6 com infusão células no 15º,30º e 45º dias pós-operatório.

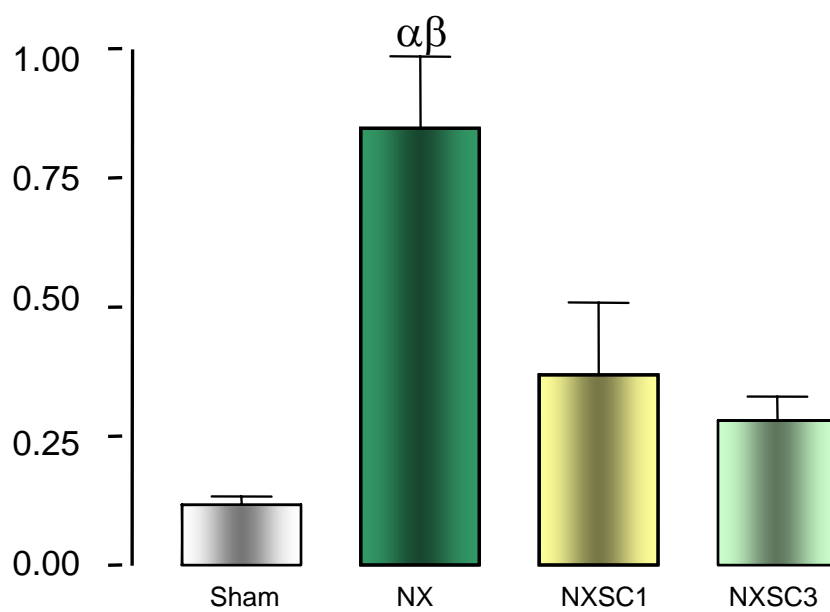
4.10. Imunohistoquímica para ED-1 (macrófagos):

Nos glomérulos, o número de células coradas para ED-1 foi significativamente reduzido nos animais NXSC1 e NXSC3 ($0,37 \pm 0,14$ e $0,28 \pm 0,05$ células/glomérulo, respectivamente), quando comparados com os não tratados NX = $0,84 \pm 0,14$ células/glomérulo ($p < 0,05$). No compartimento túbulo-intersticial verificou-se no NX: $12,35 \pm 3,35$ células/ $0,245 \text{ mm}^2$ e redução significativa nos

animais NXSC1 ($4,64 \pm 0,68$ céls/ $0,245$ mm²) e NXSC3 ($4,64 \pm 1,12$ céls/ $0,245$ mm²) ($p < 0,01$) (Figura 10 a e b e Figura 11)

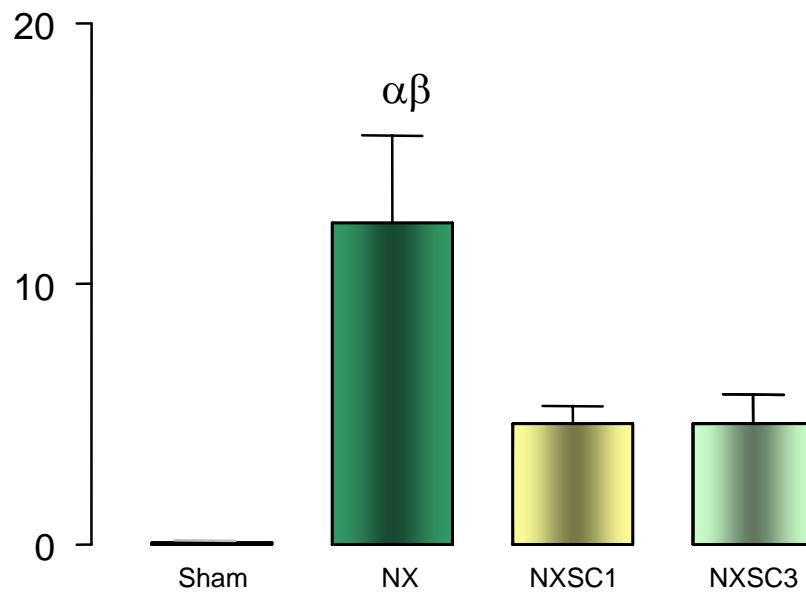
Infiltração tecidual por macrófagos (ED1)

(a) infiltração em glomérulos (céls/glom):



α $p < 0,001$ vs. Sham; β $p < 0,05$ vs. NXSC1 e NXSC3

(b) infiltração em compartimento túbulo-intersticial (célis/0,245mm²)



^αp < 0,001 vs. Sham; ^βp < 0,01 vs NXSC1 e NXSC3

Figura 10: Gráfico da infiltração tecidual por macrófagos (ED1) em glomérulos (a) e em compartimento túbulo-intersticial (b) em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório.

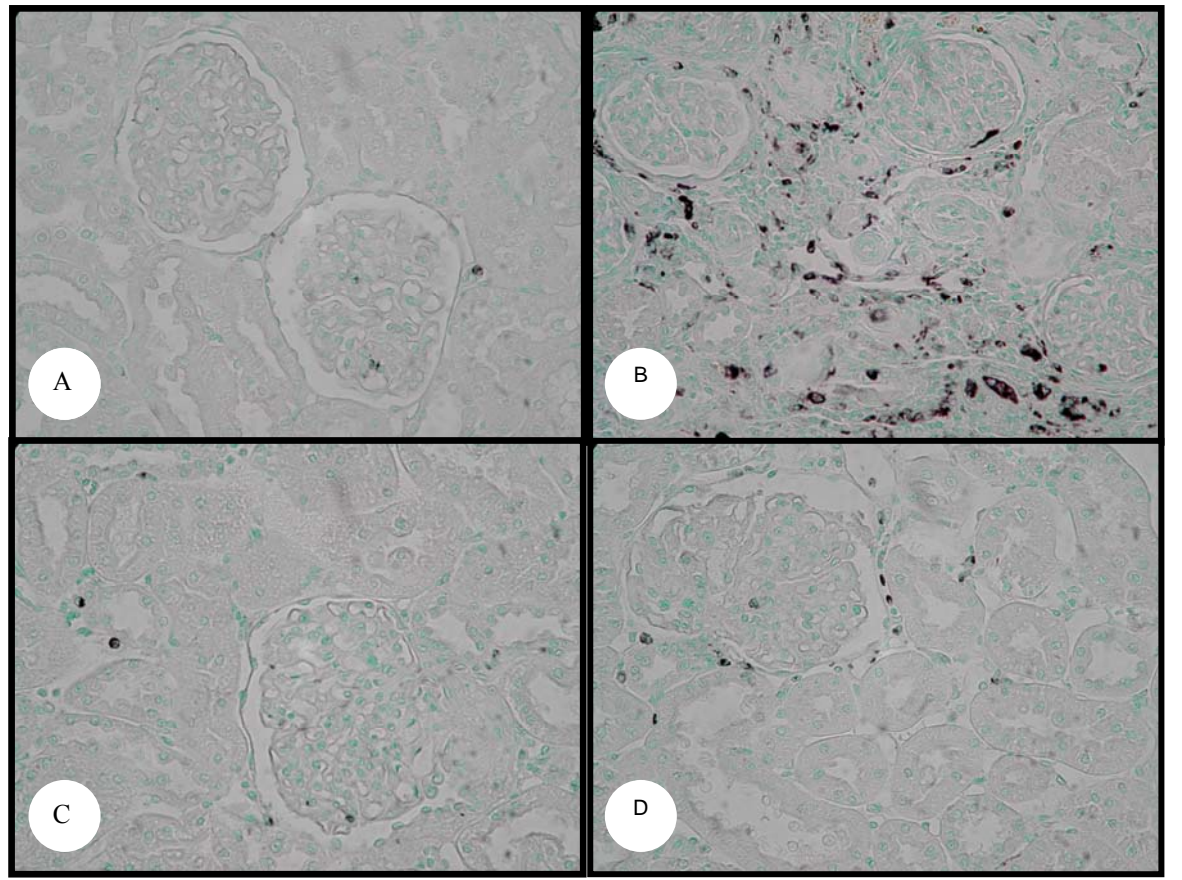


Figura 11: Fotos representativas da infiltração tecidual por macrófagos (ED-1) em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório: (A) rato controle, (B) rato 5/6 sem células Lin (C) rato 5/6 com infusão células no 15º dia pós-operatório e (D) rato 5/6 com infusão células no 15º, 30º e 45º dias pós-operatório.

4.11. Imunohistoquímica para CD3 (linfócitos T):

A análise imunohistoquímica demonstrou diminuição do infiltrado de linfócitos nos grupos NXSC1= $3,07 \pm 0,33$ e NXSC3= $3,94 \pm 0,49$ céls/0,245 mm², quando comparados aos animais não tratados NX= $5,73 \pm 0,94$ céls/0,245 mm² ($p < 0,05$). (Figura 12 e 13)

Infiltração tecidual por linfócitos (CD3) (célis/0,245mm²):

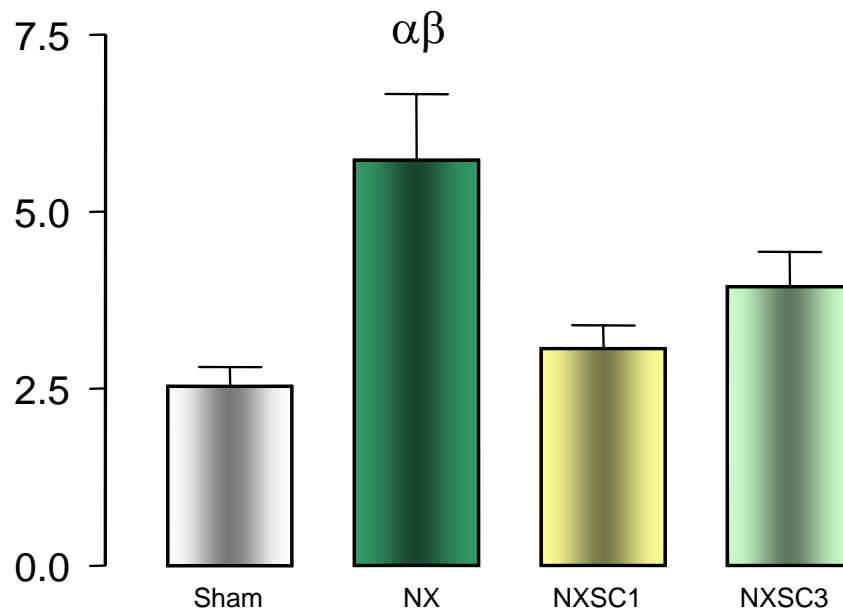


Figura 12: Gráfico da infiltração tecidual por linfócitos (CD3) em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório. $\alpha p < 0,01$ vs. Sham; $\beta p < 0,05$ vs. NXSC1 e NXSC3

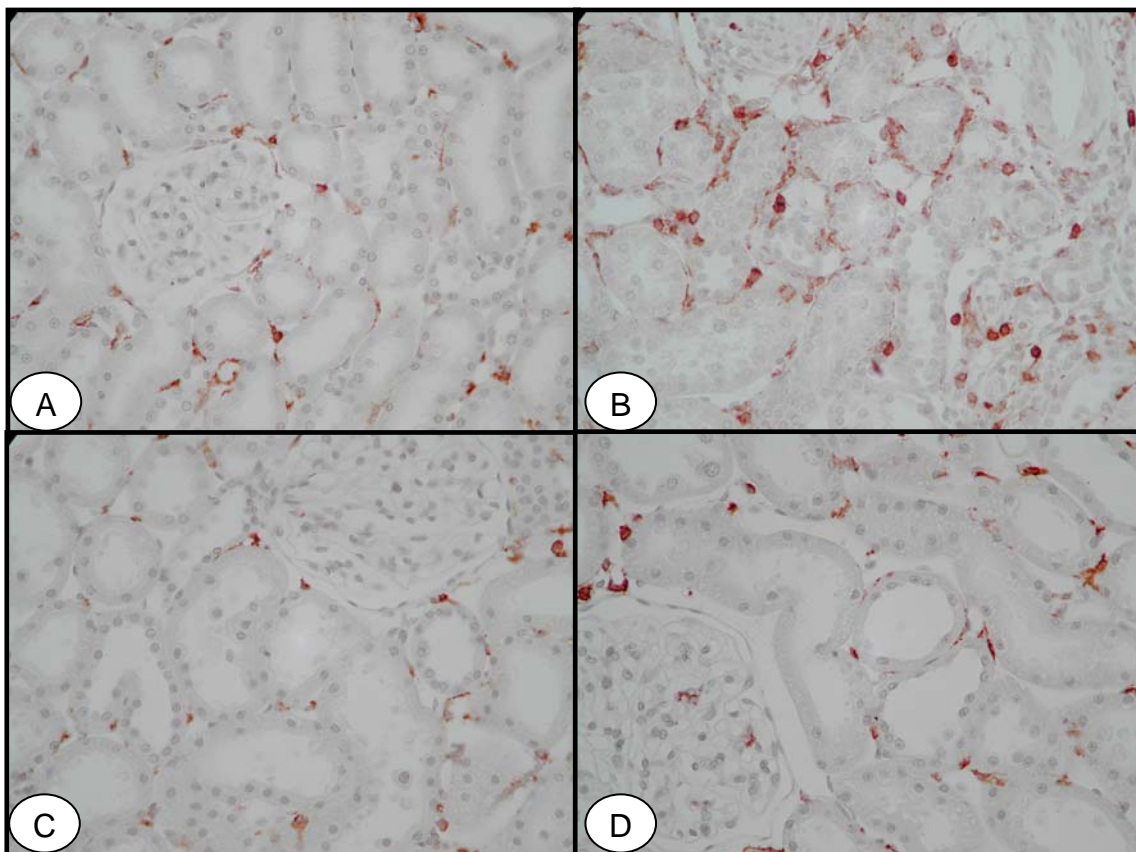


Figura 13: Fotos representativas da infiltração tecidual por linfócitos (CD3) em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório: (A) rato controle, (B) rato 5/6 sem células Lin (C) rato 5/6 com infusão células no 15º dia pós-operatório e (D) rato 5/6 com infusão células no 15º,30º e 45º dias pós-operatório.

4.12. Imunohistoquímica para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular):

Pode-se observar que houve aumento do número de células em proliferação no grupo NX = $36,98 \pm 8,06$ céls/ $0,245\text{mm}^2$ quando comparado ao grupo Sham = $1,44 \pm 0,19$ céls/ $0,245\text{mm}^2$. Houve diminuição do número de células em proliferação nos grupos NXSC1= $9,75 \pm 2,95$ e NXSC3 = $2,67 \pm 0,53$ céls/ $0,245$

mm² quando comparados aos animais não tratados NX= 36,32 ± 9,84 céls/0,245 mm² (p<0,001). (Figura 14 e 15)

Expressão tecidual de antígeno nuclear de células em proliferação
(PCNA) (céls/0,245mm²):

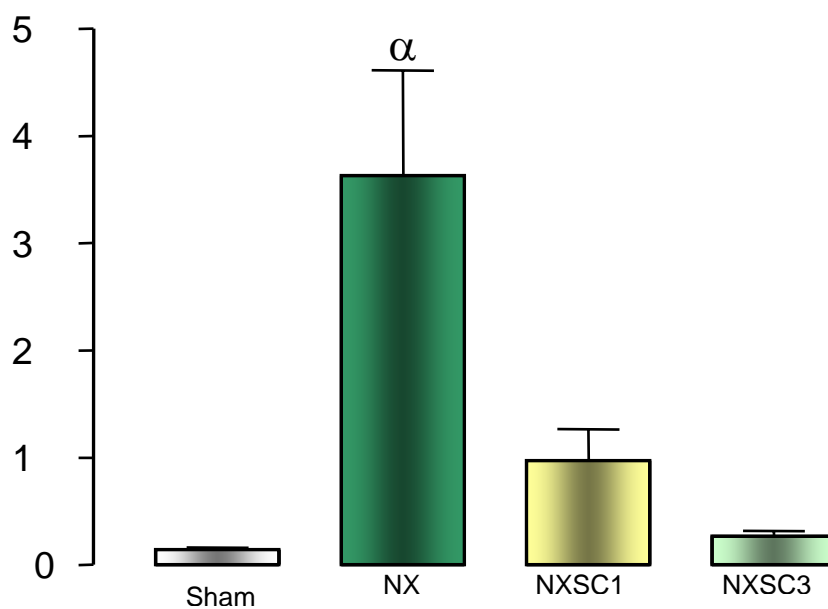


Figura 14: Gráfico expressão tecidual de antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório. ^αp < 0,001 vs. todos os grupos.

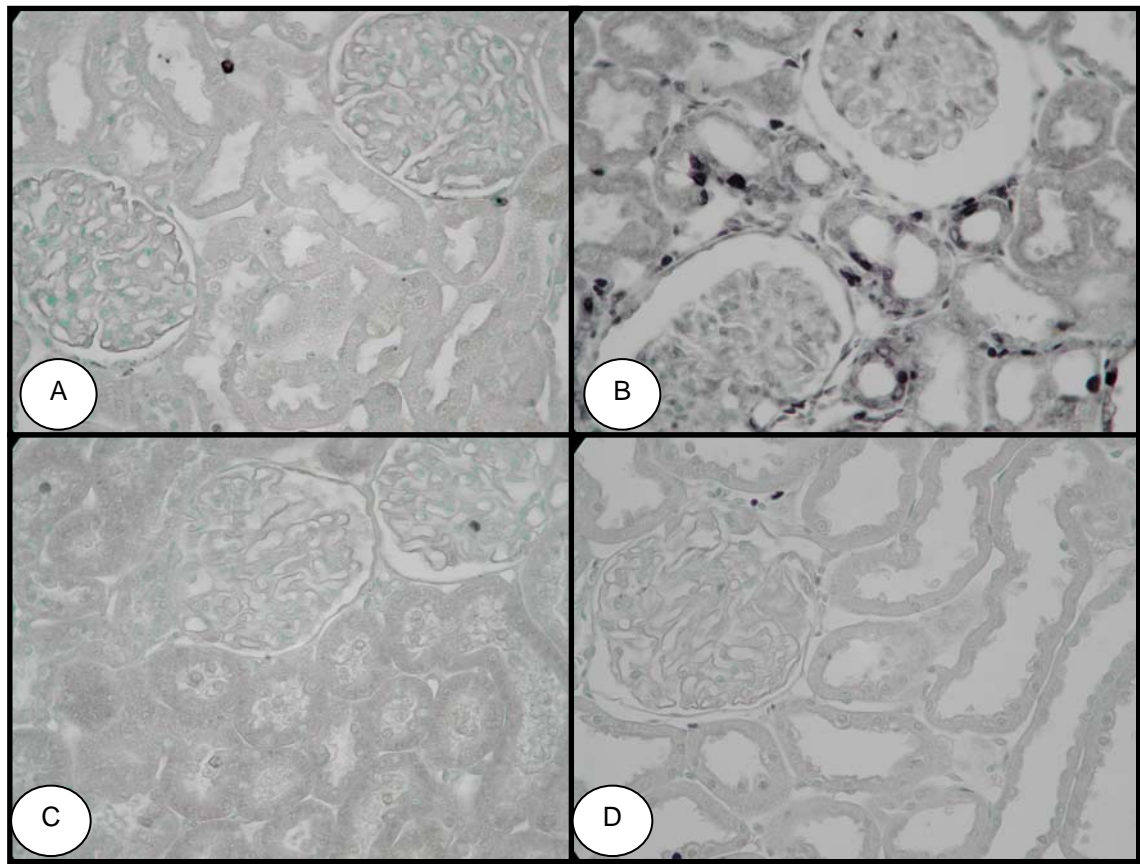


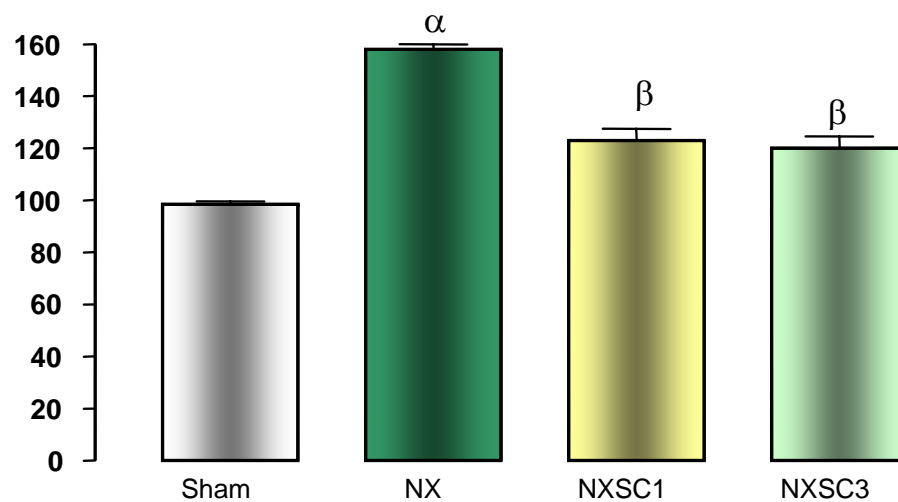
Figura 15: Fotos representativas da expressão tecidual de antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório (A) rato controle, (B) rato 5/6 sem células Lin⁻ (C) rato 5/6 com infusão células no 15º dia pós-operatório e (D) rato 5/6 com infusão células no 15º,30º e 45º dias pós-operatório.

4.13. Western blotting para MCP-1 (proteína quimiotática de macrófagos):

Entre as quimiocinas que regulam a resposta inflamatória em modelos de doença renal crônica, a MCP-1 é uma das mais importantes. A expressão foi marcadamente aumentada no grupo NX (sham: $98,50 \pm 1,19\%$ vs. NX: $157,71 \pm 2,14\%$, $p < 0,001$) (Figura 16 A e B). A infusão de células Lin⁻ significativamente diminuiu a expressão da MCP-1 (NX: $157,71 \pm 2,14\%$ vs. NXSC1: $123,30 \pm 4,65\%$ e NXSC3: $120 \pm 4,60\%$, $p < 0,001$).

Expressão da proteína MCP-1 (%):

(a)



α p < 0,001 vs. todos os grupos; β p < 0,01 vs. Sham

(b)

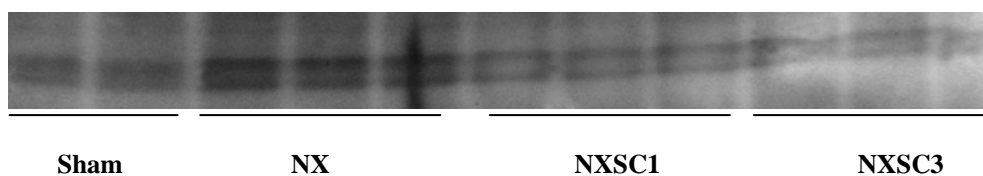


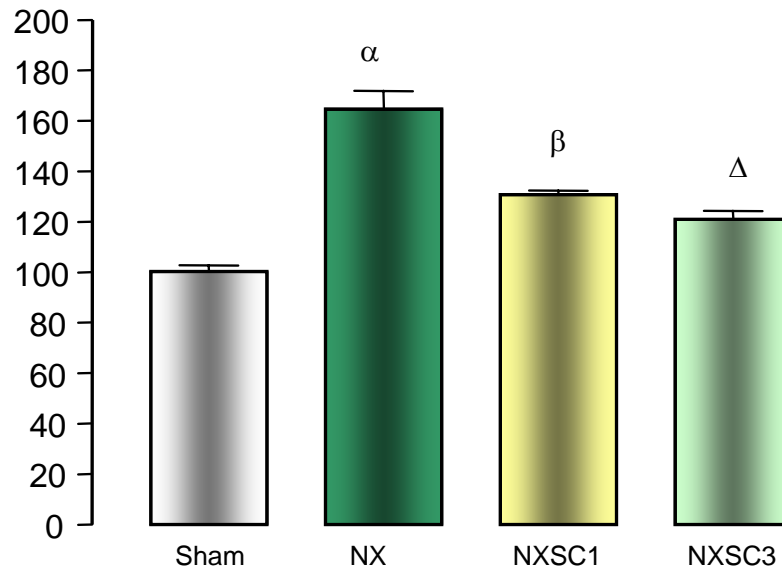
Figura 16: (a) Gráfico da análise densitométrica da expressão da proteína MCP-1; (b) Imunoblots para anti-MCP-1 revelando uma banda de aproximadamente 7 kDa; em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório.

4.14. Western blotting para VEGF (fator de crescimento endotelial vascular):

O VEGF está envolvido na patogênese da hipertrofia glomerular. Neste modelo a expressão do VEGF foi maior no grupo NX e foi reduzida após injeção de células Lin⁻. (Sham: $100,3 \pm 2,4\%$, NX: $164,8 \pm 7,15\%$, NXSC1: $130,7 \pm 1,80\%$ e NXSC3: $121,2 \pm 3,27\%$, $p < 0,001$) (Figura 17 a e b)

Expressão da proteína VEGF (%):

(a)



α $p < 0,001$ vs. todos os grupos; β $p < 0,001$ vs. Sham; Δ $p < 0,01$ vs. Sham

(b)

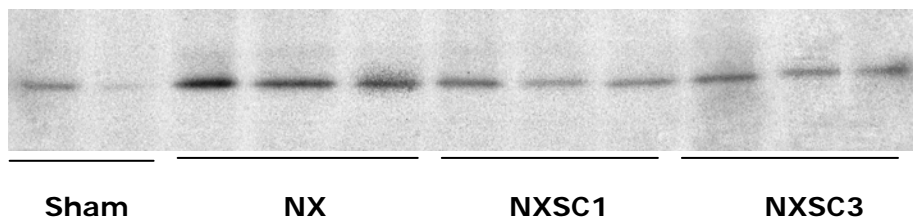


Figura 17: (a) Gráfico da análise densitométrica da expressão da proteína VEGF; (b) Imunoblots para anti-VEGF revelando uma banda de aproximadamente 25 kDa; em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório.

4.15. Área glomerular:

Os animais submetidos à nefrectomia apresentaram maior volume glomerular que os animais controle (Sham= 11930 ± 408 vs NX $15300 \pm 1140 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$), entretanto não foi observada diferença entre os animais que receberam ou não as células Lin^- (NX $15300 \pm 1140 \mu\text{m}^2$, NXSC1= $15080 \pm 233 \mu\text{m}^2$ e NXSC3 = $15610 \pm 901 \mu\text{m}^2$, $p > 0,05$). (Figura 18).

Área glomerular (μm^2):

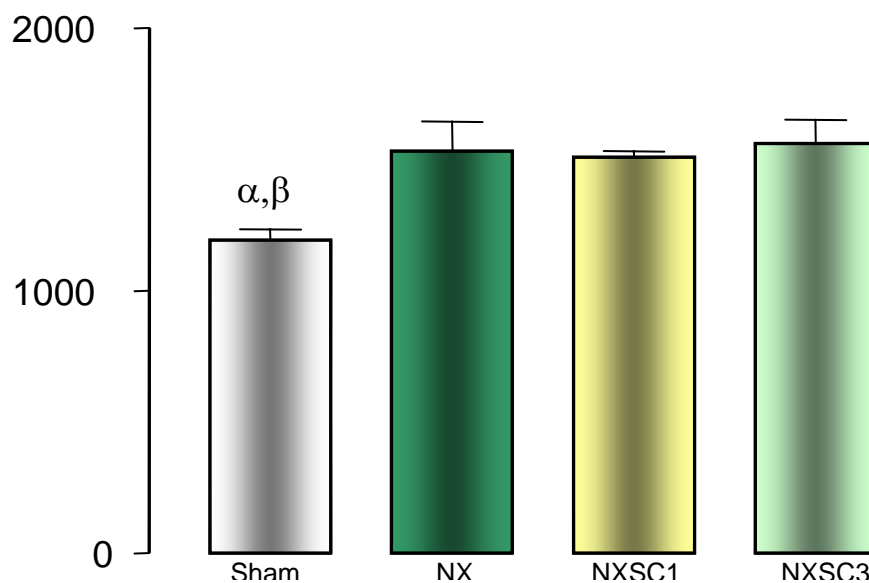


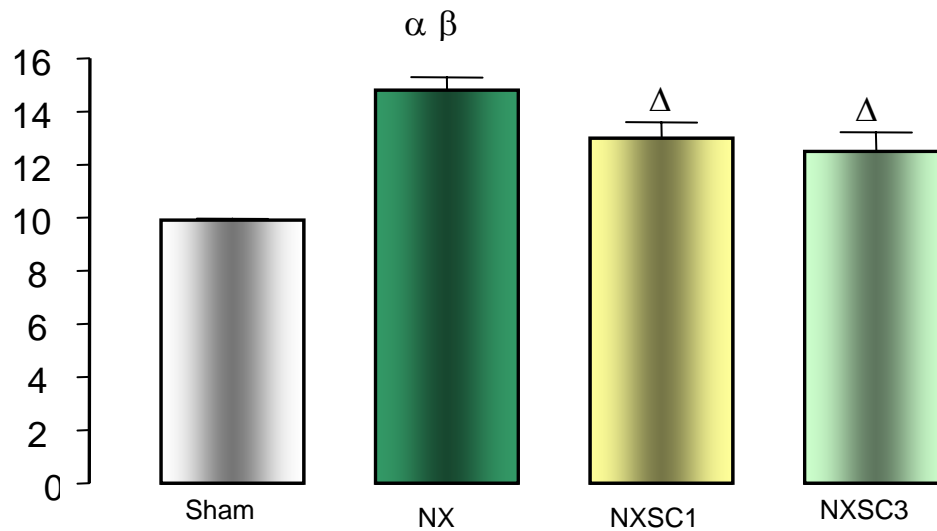
Figura 18: Gráfico área glomerular em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório. $\alpha_p < 0,05$ vs. NX e NXSC3; $\beta_p < 0,01$ vs. NXSC1

4.16. Western blotting para p21:

A expressão da proteína p21 foi significativamente aumentada nos animais operados (Sham: $99,5 \pm 0,8\%$ vs. NX: $148,1 \pm 4,0\%$, $p < 0,01$) e reduzida após a infusão de células Lin^- (NX: $148,1 \pm 4,0\%$ vs. NXSC1: $130,1 \pm 5,7\%$ e NXSC3: $125,0 \pm 7,9\%$, $p < 0,05$). (Figura 19 a e b)

Expressão da proteína p21 (%):

(a)



α $p < 0,001$ vs. Sham; β $p < 0,05$ vs. NXSC1 and NXSC3; Δ $p < 0,01$ vs. Sham

(b)

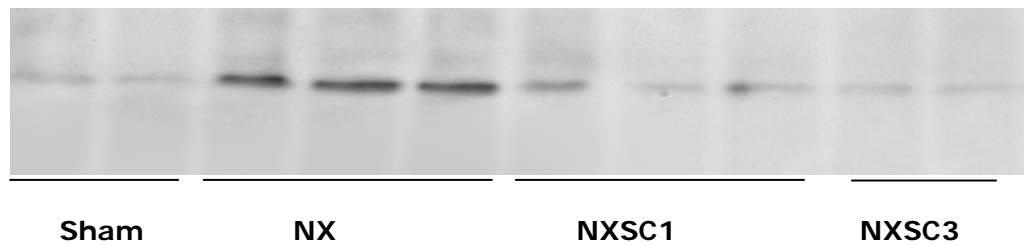


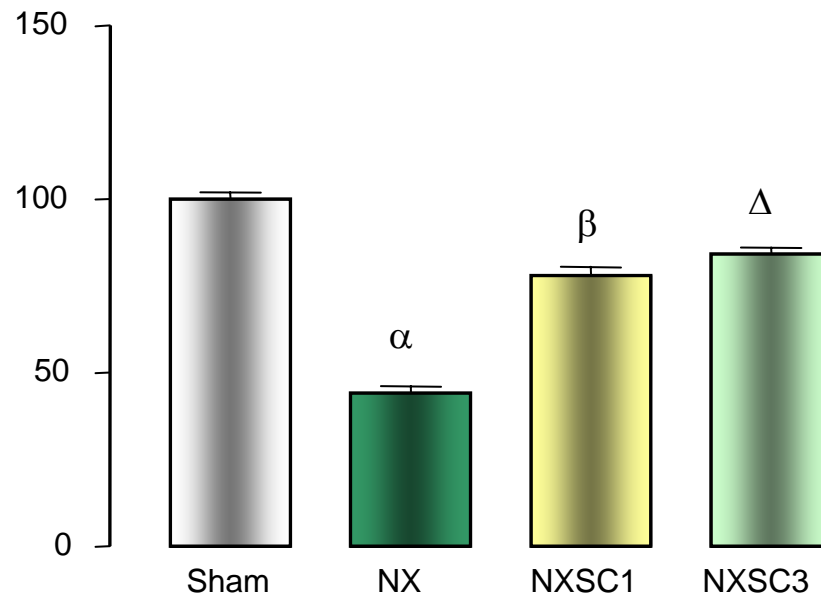
Figura 19: (a) Gráfico da análise densitométrica da expressão da proteína p21; (b) Immunoblots para anti-p21 revelando uma banda de aproximadamente 25 kDa; em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório.

4.17. Western blotting para eNOS (óxido nítrico sintetase endotelial):

A expressão da proteína eNOS foi significativamente reduzida nos animais operados (Sham: $100,0 \pm 2,0\%$ vs. NX: $44,2 \pm 1,8\%$, $p < 0,001$) e aumentada após a infusão de células Lin^- (NX: $44,17 \pm 1,8\%$ vs. NXSC1: $78,0 \pm 2,5\%$ e NXSC3: $84,3 \pm 1,8\%$, $p < 0,001$). (Figura 20 a e b)

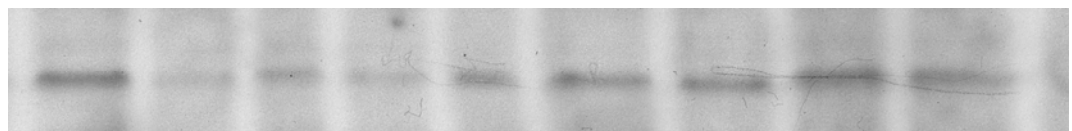
Expressão da proteína eNOS (%):

(a)



^αp < 0,001 vs. todos os grupos ^βp < 0,001 vs. Sham; ^Δp < 0,01 vs. Sham

(b)



Sham

NX

NXSC1

NXSC3

Figura 20: (a) Gráfico da análise densitométrica da expressão da proteína eNOS; (b) Imunoblots para eNOS revelando uma banda de aproximadamente 135 kDa; em animais Sham, NX, NXSC1 e NXSC3 no 60º dia de pós-operatório.

5. Discussão

As nefropatias progressivas que levam à esclerose glomerular, fibrose intersticial e doença renal terminal podem ser iniciadas por mecanismos imunes e não imunes. Qualquer que seja entretanto, o mecanismo iniciador, a perpetuação da lesão renal depende de uma complexa cadeia de eventos que envolve a participação de mecanismos inflamatórios como proliferação de fibroblastos, ativação de macrófagos e excessiva produção de matriz extracelular.(33) Dada à complexidade dos mecanismos de progressão vários tipos de estratégias têm sido tentadas tanto em caráter clínico como experimental para tentar retardar a inexorável evolução da doença renal crônica (DRC).

Baseados nos estudos que demonstram a participação da angiotensina na progressão da doença renal, inúmeros trabalhos usando inibidores de enzima conversora de angiotensina em diferentes doses já foram publicados nos últimos anos, bem como trabalhos utilizando bloqueadores dos receptores de angiotensina.(34-36) A maior parte desses trabalhos conseguiu demonstrar melhora nos parâmetros de injúria renal apesar de nem sempre conseguir isolar os efeitos de melhora pressórica dos efeitos diretos das drogas no retardo da progressão da doença renal.

Na tentativa de bloquear os processos inflamatórios envolvidos na progressão da doença renal, alguns autores usaram drogas como micofenolato de mofetil e anti-inflamatórios em modelos de doença renal crônica experimental com resultados satisfatórios.(37;38) Adicionalmente, e levando em consideração a participação do estresse oxidativo na progressão da injúria renal, Shimizu e colaboradores demonstraram que o uso do anti-oxidante N-acetilcisteína diminuía os

escores de lesão histológica além de melhorar o clearance de inulina de animais submetidos à nefrectomia 5/6 (ablação renal subtotal).(39)

Com a perspectiva de utilização de células tronco em doenças neurológicas degenerativas, insuficiência cardíaca congestiva, dentre outras doenças crônicas; surgiu o interesse de avaliar se essas células poderiam exercer algum efeito benéfico em um modelo experimental de DRC. Um dos primeiros trabalhos que avaliou a participação dessas células em modelos de esclerose glomerular e fibrose intersticial foi publicado em janeiro de 2006, em um modelo de glomerulonefrite.(28) Trata-se de um modelo de doença renal crônica onde há predomínio de mecanismos imunes na injúria tecidual inicial, que não representa o principal mecanismo envolvido na etiologia das principais causas de DRC em pacientes.(40) Nesse modelo os autores injetaram anticorpo monoclonal anti-Thy-1.1 e realizaram nefrectomia unilateral resultando em alterações típicas de doença renal crônica. Após sete dias as células de medula óssea foram injetadas via veia caudal e os animais foram seguidos por 84 dias. Ao final desse período, eles demonstraram redução da proteinúria, melhora da injúria histológica, menor mortalidade e menor nível de disfunção renal, medida pela creatinina plasmática, nos animais que receberam a infusão de células da medula óssea.

Ainda dentro do grupo das doenças crônicas, dois estudos foram realizados em um modelo similar à doença de Alport (camundongos que não expressam o gene da cadeia $\alpha 3$ do colágeno tipo IV). Foram utilizados dois protocolos diferentes de uso de células de medula óssea. No estudo em que foram utilizadas células mesenquimais isoladamente houve melhora da fibrose intersticial sem ter havido retardo na progressão da doença renal, enquanto no estudo em que

foram usadas células de medula óssea total houve redução da proteinúria e da uréia após 21 semanas.(29-31) Esses dados sugerem que diferentes tipos de células tronco podem apresentar resultados diversos dentro de uma mesma patologia.

Utilizando entretanto o modelo clássico de nefrectomia 5/6, apenas um grupo de autores publicou resultados. Zerbini e colaboradores apresentaram dados de estudo em animais submetidos à nefrectomia 5/6 e posterior infusão de células de baço e de medula óssea total em diferentes concentrações. Após oito semanas não havia diferença com relação a parâmetros funcionais entre animais que receberam e os que não receberam a infusão de células.(32) Persistia ainda a dúvida com relação ao potencial de uso de subgrupos específicos de células tronco de medula óssea nesse modelo de DRC. Em nosso trabalho usamos especificamente as células linhagem negativa (Lin⁻) de medula óssea.

De acordo com a metodologia descrita anteriormente, são excluídas no processo de seleção negativa das células de medula óssea: os eritrócitos, os linfócitos T e B, granulócitos e monócitos. Portanto, o *pool* de células resultante engloba tanto células tronco hematopoiéticas como mesenquimais, sendo que as últimas são encontradas em percentual menor no tecido medular.

Foram utilizados ratos singênicos Fischer 344. Esses animais apresentam características distintas com relação aos ratos Wistar classicamente utilizados nos trabalhos de DRC. Uma dessas diferenças é que a hipertensão e a proteinúria desenvolvem-se após oito e quatro semanas respectivamente, após a ablação renal subtotal, ou seja, mais tardiamente que nos ratos Wistar. (41)

Oito semanas após a ablação renal os animais apresentaram hipertensão arterial, proteinúria, redução do clearance de inulina e do hematócrito e

aumento dos níveis de aldosterona sérica, comprovando a eficácia do modelo na indução da doença renal crônica experimental (ver Tabela 1). Foram também observados esclerose glomerular, expansão intersticial e infiltração de macrófagos e linfócitos, achados compatíveis com doença renal crônica. Os níveis de proteinúria e de alteração histológica são sugestivos de lesões em fases iniciais de DRC.

Há evidências na literatura que a hipertensão e a aldosterona estão entre os mais importantes fatores patogênicos na progressão da doença renal. (42;43) Em nosso modelo foi verificada diminuição significativa da proteinúria, acompanhada por melhora nos índices de esclerose glomerular e na área intersticial relativa, nos animais submetidos à infusão de células Lin⁻ independente do número de infusões realizadas e a despeito de não haver diferença nos níveis pressóricos e de aldosterona sérica entre os animais tratados e não tratados. Esse achado dissocia a redução da proteinúria dos efeitos pressóricos e permite aventar que outros mecanismos estejam implicados nesse resultado.

Os principais mecanismos envolvidos na progressão da doença renal crônica têm sido classicamente divididos em dois grupos: imunológicos e não imunológicos. (44;45) Os estudos usando o micofenolato mofetil - que é um inibidor específico da proliferação de linfócitos- em modelos de ablação renal demonstraram atenuação da progressão da DRC através de mecanismo imune.(38) Em nosso estudo foi observada uma redução significativa do número de linfócitos nos animais que receberam as infusões de células quando comparados aos animais não tratados. (NX= $5,73 \pm 0,94$ vs NXSC1= $3,07 \pm 0,33$ e NXSC3 = $3,94 \pm 0,49$ céls/0,245 mm², p<0,05). Adicionalmente foi observada uma redução do número de macrófagos infiltrando o tecido renal.

Esses achados são compatíveis com uma menor atividade inflamatória no tecido renal nos animais que receberam infusão de células Lin⁻ o que resultou em menor gravidade da lesão histológica e redução da proteinúria. Esses efeitos imunomoduladores das células tronco já foram demonstrados em diversos outros trabalhos. Células mononucleares derivadas de medula óssea expressam fatores de crescimento de fibroblastos e angiopoetinas, o que demonstra seu potencial de ação parácrino.(46) Além disso, células mesenquimais de medula óssea em meio de cultura podem modular a produção de INF- γ e IL-4. (47)

Já com relação às células tronco hematopoiéticas há poucos dados na literatura quanto ao seu potencial imunomodulador. O mais importante desses dados foi encontrado em um estudo em modelo de insuficiência renal aguda. Nesse trabalho os autores demonstraram que muito mais que um papel de diferenciação celular, essas células exerceram um papel imunomodulador que resultou em menor injúria tecidual renal.(48) A melhora da lesão renal foi atribuída à menor expressão de L-selectina em células inflamatórias o que resultou em menor adesão dessas células ao tecido renal.

Dentre as moléculas que estão envolvidas na patogênese da DRC uma das mais importantes é a MCP-1 que se correlaciona com a proteinúria e a infiltração de macrófagos. Há forte evidência na literatura que ela está associada ao desenvolvimento de fibrose.(49) No presente estudo foi demonstrada uma redução importante da expressão da MCP-1. Não é entretanto possível esclarecer se isso ocorreu em decorrência da melhora da proteinúria ou como efeito direto da infusão celular.

É interessante verificar que não foi observada diferença nos parâmetros discutidos até então, entre os animais que receberam uma infusão de células Lin⁻ e os animais que receberam três infusões de células Lin⁻. Esse dado contradiz a possibilidade dos resultados serem atribuídos à diferenciação celular direta e corroboram a hipótese de imunomodulação, uma vez que os animais que receberam um maior número de células deveriam apresentar melhores resultados. Adicionalmente os achados de que a infusão de células no 15º dia de pós operatório tem resultados semelhantes à infusão em 3 diferentes momentos, sugere que o benefício dessas células se dá nos estágios iniciais de instalação da DRC. Posteriores estudos são necessários para avaliar o potencial uso dessas células em momentos mais tardios de evolução da doença.

Ao analisar os dados de hematócrito percebe-se que os animais com DRC apresentaram níveis mais baixos de hematócrito que os animais controle, com retorno a valores próximo do normal após infusão de células Lin⁻. Isso pode se dever ao fato de que os animais que receberam as células apresentam menor grau de injúria intersticial, local onde ocorre a produção de eritropoetina e, portanto, maior possibilidade de manter a estimulação para produção de hemáceas. Entretanto, não se pode afastar a possibilidade de algumas células Lin⁻ terem se diferenciado em hemáceas.

Após a ablação renal o aumento tecidual que se observa é uma consequência da hiperplasia e da hipertrofia dos glomérulos e compartimentos epiteliais renais. (35) Entretanto, a longo prazo, a hipertrofia se transforma em uma resposta mal-adaptativa resultando em perda de tecido renal. (50) Tem sido demonstrado que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um mediador

importante da hipertrofia glomerular após a nefrectomia subtotal. Schrijvers e colaboradores (51) usaram um anticorpo anti VEGF em um modelo de nefrectomia subtotal e observaram redução da proteinúria e da esclerose glomerular. Os mesmos efeitos foram demonstrados em modelos de nefropatia diabética. (52) Foi aqui demonstrado que a infusão de células Lin⁻ resultou em menor expressão tecidual de VEGF, que poderia ter sido responsável por menor hipertrofia glomerular e melhora da proteinúria. Entretanto nessa fase da DRC no modelo usado não encontramos diferença entre os grupos em termos de área glomerular.

Com relação à hiperplasia, esta parecer ser uma via melhor de adaptação renal. Um das principais proteínas envolvidas nessa via é a proteína p21. Megyesi e colaboradores demonstraram que camundongos que não expressavam essa proteína apresentavam menor progressão da DRC.(53) Já foi também demonstrado que a proteína p21 é requerida para apoptose de podócitos induzida por TGF- β e pelo aminoglicosídeo puromicina.(54). Alguns outros trabalhos têm mostrado que a expressão de p21 está aumentada em podócitos em patologias como a nefropatia membranosa e a GESF colapsante.(55;56) Em nosso modelo, a nefrectomia 5/6 resultou em aumento da expressão da proteína p21 que foi reduzida pela infusão de células, o que pode ter colaborado para atenuar a progressão da DRC.

De forma inesperada, apesar da redução da expressão da proteína p21 não foi observada menor proliferação celular avaliada pelo PCNA nos animais tratados com células Lin⁻; do contrário, os animais com menor expressão de p21 apresentavam menor proliferação celular. Esse achado, entretanto, já foi encontrado em outros trabalhos onde p21 e PCNA são modulados no mesmo sentido.(57-59) Tem sido sugerido que em algumas situações a *downregulation* do

p21 coincide com menor expressão de ciclina e menor expressão de PCNA, o que pode ter acontecido no nosso modelo.

Já foi demonstrado anteriormente que a manutenção dos níveis de óxido nítrico (NO) no tecido renal, avaliada pela expressão dos genes ou de proteínas do grupo das NO sintetases, está associada à proteção renal.(60) Os animais nefrectomizados apresentaram uma redução da expressão tecidual da eNOS sintetase que foi parcialmente revertida pela infusão de células, resultando em um menor dano tecidual.

Em resumo, os nossos resultados demonstraram que a infusão de células Lin⁻atenuou o dano renal produzido pela nefrectomia 5/6, o que se manifestou por redução da proteinúria, do índice de esclerose glomerular e da área intersticial relativa. Esse efeito foi acompanhado por uma diminuição do infiltrado de células inflamatórias e da expressão de VEGF e p21, sugerindo um papel imunomodulador dessas células nesse modelo de DRC. Adicionalmente, foi verificado que os animais que receberam as células apresentavam uma maior expressão da eNOS.

6. Conclusões

- ✓ Os animais Fischer 344 submetidos à ablação renal subtotal desenvolveram proteinúria, hipertensão, anemia, redução do clearance de inulina e alterações histológicas compatíveis com doença renal crônica.
- ✓ A infusão de células linhagem negativa de medula óssea atenuou todos os marcadores de injúria renal, com uma importante redução da infiltração tecidual por linfócitos e macrófagos sugerindo um efeito imunomodulador dessas células.
- ✓ Foi observada uma redução da expressão do p21 e do VEGF ambos já relacionados com a aceleração da progressão da doença renal .
- ✓ Adicionalmente, a infusão de células Lin⁻ resultou em maior expressão da proteína eNOS que pode ter contribuído para o retardo da progressão da lesão renal.

7. Referências

Bibliográficas

- (1) Al-Awqati Q, Oliver JA. Stem cells in the kidney. *Kidney Int* 2002 Feb;61(2):387-95.
- (2) Mollura DJ, Hare JM, Rabb H. Stem-cell therapy for renal diseases. *Am J Kidney Dis* 2003 Nov;42(5):891-905.
- (3) Tersirih AV, Easterday MC, Lea L. From hematopoiesis to neuropoiesis: Evidence of overlapping genetic programs. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7934-7939. 2001.
- (4) Biorson CR, Rietze RL, Reynolds BA. Turn brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *science* 283, 534-537. 1999.
- (5) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997 Feb 14;275(5302):964-7.

- (6) Ferrari G, Cusella-De AG, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998 Mar 6;279(5356):1528-30.
- (7) Kraus DS, Theise ND, Collector M. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377. 2001.
- (8) 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.
- (9) Iwatami T, Ito T, Imai E. Differentiation potentials of Hoechstlow cells that are derived from adult rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 13, 299A.
- (10) Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarajah S, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 2001 Sep;195(2):229-35.

- (11) Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol* 2001 Dec;12(12):2625-35.
- (12) 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.
- (13) Danet GH, Pan Y, Luongo JL, Bonnet DA, Simon MC. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest* 2003 Jul;112(1):126-35.
- (14) Morrison SJ, Csete M, Groves AK, Melega W, Wold B, Anderson DJ. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J Neurosci* 2000 Oct 1;20(19):7370-6.
- (15) 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.

- (16) Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS, Cantley LG. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest* 2003 Jul;112(1):42-9.
- (17) Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kim Y, Rosenberg ME. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int* 2002 Oct;62(4):1285-90.
- (18) Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Zhong Y, Nagasawa R, Okabe M, et al. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001 Jul;12(7):1401-9.
- (19) 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.
- (20) 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.

- (21) 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.
- (22) 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.
- (23) 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.
- (24) 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.

- (25) Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005 Jul;289(1):F31-F42.
- (26) 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.
- (27) Firkin F, Hill PA, Dwyer K, Gock H. Reversal of dialysis-dependent renal failure in light-chain deposition disease by autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Am J Kidney Dis* 2004 Sep;44(3):551-5.
- (28) Li B, Morioka T, Uchiyama M, Oite T. Bone marrow cell infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat model. *Kidney Int* 2006 Jan;69(2):323-30.
- (29) Prodromidi EI, Poulsom R, Jeffery R, Roufosse CA, Pollard PJ, Pusey CD, et al. Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells* 2006 Nov;24(11):2448-55.

- (30) Ninichuk V, Gross O, Segerer S, Hoffmann R, Radomska E, Buchstaller A, et al. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int* 2006 Jul;70(1):121-9.
- (31) Sugimoto H, Mundel TM, Sund M, Xie L, Cosgrove D, Kalluri R. Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 May 9;103(19):7321-6.
- (32) Zerbini G, Piemonti L, Maestroni A, Dell'Antonio G, Bianchi G. Stem cells and the kidney: a new therapeutic tool? *J Am Soc Nephrol* 2006 Apr;17(4 Suppl 2):S123-S126.
- (33) Fujihara CK, Velho M, Malheiros DM, Zatz R. An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. *Kidney Int* 2005 May;67(5):1913-24.
- (34) Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Couser WG, Koch KM, et al. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Int* 1996 Mar;49(3):666-78.

- (35) Floege J, Burns MW, Alpers CE, Yoshimura A, Pritzl P, Gordon K, et al. Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Kidney Int* 1992 Feb;41(2):297-309.
- (36) Schiller B, Moran J. Focal glomerulosclerosis in the remnant kidney model-- an inflammatory disease mediated by cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 1997 Mar;12(3):430-7.
- (37) Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, Andreoli N, Malheiros DM, Noronha IL, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition limits abnormal COX-2 expression and progressive injury in the remnant kidney. *Kidney Int* 2003 Dec;64(6):2172-81.
- (38) Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, Noronha ID. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int* 1998 Nov;54(5):1510-9.
- (39) Shimizu MH, Coimbra TM, de AM, Menezes LF, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. *Kidney Int* 2005 Nov;68(5):2208-17.

- (40) Noronha IL, Schor N, Coelho SN, Jorgetti V, Romao Junior JE, Zatz R, et al. Nephrology, dialysis and transplantation in Brazil. *Nephrol Dial Transplant* 1997 Nov;12(11):2234-43.
- (41) Kobayashi S, Hishida A. Effects of a calcium antagonist, manidipine, on progressive renal injury associated with mild hypertension in remnant kidneys. *J Lab Clin Med* 1995 May;125(5):572-80.
- (42) Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Converting enzyme inhibitor therapy limits progressive glomerular injury in rats with renal insufficiency. *Am J Med* 1985 Sep 27;79(3C):31-6.
- (43) Griffin KA, bu-Amarah I, Picken M, Bidani AK. Renoprotection by ACE inhibition or aldosterone blockade is blood pressure-dependent. *Hypertension* 2003 Feb;41(2):201-6.
- (44) Klahr S. Progression of chronic renal disease. *Nutrition* 1990 May;6(3):207-12.
- (45) Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I. The progression of renal disease. *N Engl J Med* 1988 Jun 23;318(25):1657-66.

- (46) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001 Aug 28;104(9):1046-52.
- (47) Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005 Feb 15;105(4):1815-22.
- (48) 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.
- (49) Wang Y, Chen J, Chen L, Tay YC, Rangan GK, Harris DC. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. *J Am Soc Nephrol* 1997 Oct;8(10):1537-45.
- (50) Yoshida Y, Fogo A, Ichikawa I. Glomerular hemodynamic changes vs. hypertrophy in experimental glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1989 Feb;35(2):654-60.

- (51) Schrijvers BF, Flyvbjerg A, Tilton RG, Rasch R, Lameire NH, De Vriese AS. Pathophysiological role of vascular endothelial growth factor in the remnant kidney. *Nephron Exp Nephrol* 2005;101(1):e9-15.
- (52) Kelly DJ, Buck D, Cox AJ, Zhang Y, Gilbert RE. Effects on protein kinase C-beta inhibition on glomerular vascular endothelial growth factor expression and endothelial cells in advanced experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007 Aug;293(2):F565-F574.
- (53) Megyesi J, Price PM, Tamayo E, Safirstein RL. The lack of a functional p21(WAF1/CIP1) gene ameliorates progression to chronic renal failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Sep 14;96(19):10830-5.
- (54) Wada T, Pippin JW, Terada Y, Shankland SJ. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is required for TGF-beta1-induced podocyte apoptosis. *Kidney Int* 2005 Oct;68(4):1618-29.
- (55) Ding G, Franki N, Kapasi AA, Reddy K, Gibbons N, Singhal PC. Tubular cell senescence and expression of TGF-beta1 and p21(WAF1/CIP1) in tubulointerstitial fibrosis of aging rats. *Exp Mol Pathol* 2001 Feb;70(1):43-53.

- (56) Shankland SJ, Floege J, Thomas SE, Nangaku M, Hugo C, Pippin J, et al. Cyclin kinase inhibitors are increased during experimental membranous nephropathy: potential role in limiting glomerular epithelial cell proliferation in vivo. *Kidney Int* 1997 Aug;52(2):404-13.
- (57) Zhang H, Hannon GJ, Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 1994 Aug 1;8(15):1750-8.
- (58) Labaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, et al. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 1997 Apr 1;11(7):847-62.
- (59) Law M, Forrester E, Chytil A, Corsino P, Green G, Davis B, et al. Rapamycin disrupts cyclin/cyclin-dependent kinase/p21/proliferating cell nuclear antigen complexes and cyclin D1 reverses rapamycin action by stabilizing these complexes. *Cancer Res* 2006 Jan 15;66(2):1070-80.
- (60) Erdely A, Freshour G, Smith C, Engels K, Olson JL, Baylis C. Protection against puromycin aminocycleoside-induced chronic renal disease in the Wistar-Furth rat. *Am J Phy Renal Pshysiol* 2004 Jul 15;287 (1):F 81-9.

Anexos

Dados de proteinúria em mg/24 horas:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
Rato 1	5,57	9,97	9,25	5,93
Rato 2	8,15	11,40	11,70	5,78
Rato 3	3,32	11,35	3,25	13,10
Rato 4	5,40	12,68	8,28	8,92
Rato 5	3,05	11,67	11,88	8,84
Rato 6	2,19	12,29	7,30	7,19
Rato 7	3,60	15,20	5,79	6,70
Rato 8	4,17	11,76	6,78	
Rato 9			7,33	
Rato 10			15,77	
Média±EPM	4,43±0,67	12,04±0,53 ^{a,b}	8,74±1,13 ^c	8,109±0,96 ^d

a p<0,001 versus sham, b p<0,05 versus NXSC1 e NXSC3, c p<0,01 versus sham, d p<0,05 versus sham

Dados de pressão arterial em mmHg:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
Rato 1	120	100	125	100
Rato 2	120	140	165	145
Rato 3	110	155	145	125
Rato 4	110	170	130	145
Rato 5	110	115	120	110
Rato 6	115	150	155	155
Rato 7	130	160	145	160
Rato 8	115	155	155	155
Rato 9	100	160	145	160
Rato 10	120		155	
Média±EPM	115,0±2,58 ^a	145,0±7,68	144,0±4,64	139,4±7,47

^ap < 0,01 vs. Todos os grupos

Clearance de inulina:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	0,57	0,46	0,28	0,34
R2	0,75	0,43	0,63	0,31
R3	0,67	0,23	0,20	0,28
R4	0,86	0,29	0,45	0,35
R5	0,75	0,33	0,42	0,31
R6	0,65	0,34	0,19	0,57
R7	0,59	0,34	0,46	0,26
R8		0,32	0,35	0,19
R9		0,25	0,19	
Média±EPM	0,69±0,04 ^α	0,33±0,02	0,35±0,05	0,33±0,04

^α p<0,001 versus todos os grupos

Aldosterona:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	11,4	83,0	152,0	204,0
R2	10,6	126,0	183,0	106,0
R3	6,5	86,0	58,0	98,0
R4	7,6	50,0	43,0	60,0
R5	7,3	79,0	106,0	77,0
R6	8,0	162,0	69,0	79,0
R7	7,0	130,0	142,0	105,0
R8	7,8		89,0	
Média±EPM	8,3±0,62 ^α	102,3±14,48	105,3±17,56	104,1±17,82

^α p<0,001 versus todos os grupos

Hematócrito:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	51	43	40	43
R2	51	40	36	43
R3	48	33	49	50
R4	49	41	49	50
R5	51	40	54	54
R6	56	49	52	55
R7	53	53	49	53
R8	52		50	
Média±EPM	51,38±0,86	42,71±2,48 ^a	47,38±2,17	49,71±1,87

^a p<0,05 versus Sham e NXSC3

IEG:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	4,00	104,00	82,00	42,00
R2	6,00	96,00	158,00	40,00
R3	2,00	234,00	52,00	70,00
R4	2,00	248,00	42,000	164,00
R5	0,00	178,00	24,00	30,00
R6	2,00	60,00	26,00	66,00
R7	2,00	76,00	62,00	48,00
R8	12,00	94,00		
Média±EPM	3,63 ± 0,86	125,60 ± 15,76	61,50 ± 11,48	62,93 ± 11,24

^a p<0,001 vs all groups, ^β p < 0,001 vs Sham e Δ p < 0,01 vs Sham

Área intersticial relativa:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	8,87	19,54	11,67	12,03
R2	6,29	19,62	8,81	8,18
R3	6,810	13,80	12,64	11,19
R4	6,75	14,22	11,09	13,44
R5	8,04	15,47	12,67	11,80
Média±EPM	7,35 ± 0,48	16,53 ± 1,27 ^α	11,38 ± 0,70 ^β	11,33 ± 0,87 ^Δ

^α p<0,001 vs Sham e NXSC1, ^β p<0,05 vs Sham e ^Δ p < 0,01 vs Sham e NX

ED1 (macrófagos) em glomérulos:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	0,07	4,90	4,47	4,87
R2	0,13	4,10	3,90	9,10
R3	0,10	19,30	4,96	3,43
R4	0,00	24,67	5,80	3,57
R5	0,07	8,670	3,67	8,01
R6	0,07	12,470	2,00	0,77
R7	0,13		7,70	2,73
Média±EPM	0,08 ± 0,02	12,35 ± 3,35 ^{α,β}	4,64 ± 0,68	4,64 ± 1,11

^α p < 0,001 vs. Sham; ^β p < 0,01 vs. NXSC1 and NXSC3

ED1 (macrófagos) em interstício:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	0,06	0,80	0,680	0,12
R2	0,12	0,24	0,34	0,20
R3	0,18	1,16	0,20	0,28
R4	0,14	0,92	0,12	0,50
R5	0,08	1,16	0,10	0,26
R6	0,12	0,80	0,08	0,22
R7	0,03		1,06	0,38
Média±EPM	0,11 ± 0,01	0,84 ± 0,14 ^{α,β}	0,37 ± 0,14	0,28 ± 0,05

^αp < 0,001 vs. Sham; ^βp < 0,05 vs. NXSC1 and NXSC3

CD3 (Linfócitos):

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	3,10	1,80	2,60	3,46
R2	2,40	7,30	2,90	2,60
R3	1,70	8,20	3,10	4,50
R4	3,30	2,90	4,10	3,16
R5	1,50	7,70	3,80	3,86
R6	2,90	5,50	1,90	6,03
R7	2,90	6,70		
Média±EPM	2,54 ± 0,26	5,73 ± 0,94 ^{α,β}	3,07 ± 0,33	3,94 ± 0,49

^αp < 0,01 vs. Sham; ^βp < 0,05 vs. NXSC1 and NXSC3

PCNA:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	1,47	69,23	20,53	0,87
R2	1,13	18,73	10,76	3,03
R3	0,87	43,70	2,96	3,53
R4	1,07	40,30	5,27	1,93
R5	2,43	14,23	15,72	5,13
R6	1,6	35,66	3,25	1,64
R7	1,5			2,54
Média±EPM	1,44 ± 0,19	36,98 ± 8,06 ^α	9,75 ± 2,95	2,67 ± 0,53

^αp < 0,001 vs. todos os grupos

MCP1:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	99	165	120	120
R2	100	150	110	125
R3	95	154	135	130
R4	100	160	126	98
R5		160	137	123
R6		157	112	124
Média±EPM	98,5 ± 1,2	158 ± 2,1 ^α	123 ± 4,6 ^β	120 ± 4,6 ^β

^αp < 0,001 vs. todos os grupos; ^βp < 0,01 vs. Sham

VEGF:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	106,7	152,0	127,0	123,0
R2	95,5	158,0	125,0	122,0
R3	101,0	166,0	135,0	131,0
R4	98,0	198,0	132,0	125,0
R5		150,0	136,0	119,0
R6		165,0	129,0	107,0
Média±EPM	100,3± 2,4	164,8 ± 7,2 ^α	123 ± 1,8 ^β	120 ± 3,3 ^Δ

^αp < 0,001 vs. todos os grupos; ^βp < 0,001 vs. Sham; ^Δp < 0,01 vs. Sham

p21:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	100	160	150	140
R2	98	150	130	110
R3	100	150	140	130
R4	99	150	130	110
R5		130	120	110
R6			110	150
Média±EPM	99 ± 0,5	148 ± 5,0 ^{α,β}	130 ± 6,0 ^Δ	125 ± 7,2 ^Δ

^αp < 0,001 vs. Sham; ^βp < 0,05 vs. NXSC1 and NXSC3; ^Δp < 0,01 vs. Sham

Área glomerular:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	10848	19541	14832	16180
R2	11510	18786	15081	13521
R3	12372	11819	14437	15315
R4	11427	13882	16166	16541
R5	11172	12387	14825	12239
R6	14079	16295	15630	19749
R7	12090	14405	14567	15700
Média± EPM	11930 ± 409	15300± 1140	15080± 233	15610 ± 902

^αp < 0,05 vs. NX e NXSC3; ^βp < 0,01 vs. NXSC1.

eNOS:

	Sham	NX	NXSC1	NXSC3
R1	98,0	40,5	73,0	87,0
R2	102,0	46,00	81,0	85,0
R3		46,00	80,0	81,0
Média±EPM	100,0± 2,0	44,2±1,8 ^α	78,0 ± 2,5 ^β	84,3 ±1,8 ^Δ

^αp < 0,001 vs. todos os grupos ^βp < 0,001 vs. Sham; ^Δp < 0,01 vs. Sham

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)