



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas – PCM

**Efeito do transplante de células
mononucleares da medula óssea na lesão
renal de animais *gld*
(*doença linfoproliferativa generalizada*)**

Aline Cavaliere de Nijs

Orientadora: **Prof. Christina Maeda Takiya**

Rio de Janeiro
Dezembro 2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi realizado no
Laboratório de Patologia Celular da UFRJ
Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular da UFRJ
Laboratório de Imunobiologia Parasitária do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

Este trabalho foi apresentado no Simpósio Satélite do Congresso Internacional de Nefrologia-“ World Congress of Nephrology 2007” - *Stem Cells and Renal Disease: Potential use in kidney injury* em Foz do Iguaçu, 25-27 de abril de 2007 sob a forma de pôster.

Apoio: CAPES
Instituto do Milênio de Imunologia, Incor USP
CNPq
Faperj

Efeito do transplante de células mononucleares da medula óssea na lesão renal de animais *gld* (doença linfoproliferativa generalizada)

Aline Cavaliere de Nijs

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfológicas.

Orientadora: **Prof. Dra. Christina Maeda Takiya**

Rio de Janeiro
Dezembro/2007

BANCA EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Prof. Dr^a. Maria Isabel Doria Rossi
Departamento de Histologia e Embriologia da UFRJ

Prof. Dr^a. Tatiana L. Coelho de Sampaio
Departamento de Histologia e Embriologia-UFRJ

Prof. Dr. Lúcio Ronaldo Cardoso
Disciplina de Nefrologia, Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina / HUCFF / UFRJ

SUPLENTE

Prof. Dra. Maria Eugênia Leite Duarte (Revisora)
Departamento de Histologia e Embriologia-UFRJ

Prof. Dr. Maurilo de Nazaré de Lima Leite Jr. (Membro suplente externo)
Disciplina de Nefrologia, Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina / HUCFF / UFRJ

ORIENTADORA

Profa. Dra. Christina Maeda Takyia
Universidade Federal do Rio de Janeiro

COORDENADOR DO PROGRAMA DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto

Cavaliere, Aline

Efeito do transplante de células mononucleares da medula óssea na lesão renal de animais *gld* (doença *linfoproliferativa generalizada*) /

Aline Cavaliere de Nijs. Rio de Janeiro, 2007.

83 p.

Dissertação – (Mestrado em Ciências Morfológicas) –
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de
Ciências Biomédicas, 2007.

Orientador: Christina Maeda Takiya

1. animal *gld*. 2. Glomerulonefrite proliferativa. 3. Terapia Celular – Teses. I. Takiya, Christina Maeda (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. III. Título.

A Maria, “...minha flor, meu bebê...”

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Aos meus Pais, simplesmente por tudo.

A Professora Dr^a Christina M. Takiya, minha orientadora, por ter me acolhido em seu laboratório.

Ao Professor Radovan Borojevic por ter me recebido no laboratório.

A Professora Dr^a Nádia Campos de Oliveira Miguel, que me abriu a mais importante das portas, a primeira. Obrigada pelo carinho com que me recebeu e por ter acreditado em mim.

A Professora Dr^a Maria Eugênia L. Duarte, uma bela pessoa e de contribuição fundamental.

Ao Professor Lúcio Cardoso, que começou fazer parte da minha tese nem antes nem depois, apenas no momento exato. Obrigada por seus ensinamentos.

Ao meu marido, Flávio dos Santos de Nijs, o homem, com quem desejei construir uma família desde a primeira vez que o vi.

A minha filha Maria Flor, o trabalho mais bonito que já fiz até hoje. O segundo, Francisco, já está por vir.

Aos familiares e amigos que estão sempre juntos pro que der e vier.

A amiga Cesônia Martinusso, uma pessoa de muita luz. Ela não faz idéia do quanto me ajudou.

A Professora, Dr^a, grande e velha, amiga do lado esquerdo do peito, Tania Giani.

A minha amiga Helena Figueira, que sempre, mesmo à distância, caminha ao meu lado, dividindo e compartilhando todos os momentos da minha vida. Namastê!

Aos meus amigos do lab, Bella, Bê, Pri Moreno, Pri Frazão, Ana Paty Lima, Lu (saudades), Leo e querida Sil, onde pude compartilhar ótimos, divertidos e inesquecíveis momentos, que ficarão guardados eternamente na memória.

RESUMO

O sistema Fas-FasL está envolvido no desenvolvimento de doenças auto-imunes. Cepas mutantes de Fas (*lpr*) e FasL (*gld*) apresentam um acúmulo importante de linfócitos T ($CD4^+CD8^-B220^+$) nos linfonodos causando uma linfadenopatia generalizada e produção de altos títulos de anticorpos autoreativos e lesão renal variável, sendo considerado como um modelo animal de lúpus eritematoso sistêmico. O objetivo do presente estudo foi caracterizar morfológicamente o grau de lesão renal apresentado por animais Balb/C *gld* e avaliar o papel do transplante de células mononucleares da medula óssea na atenuação da lesão glomerular desses animais. Animais Balb/C *gld* apresentaram a partir de 3 mês de idade uma glomerulonefrite por complexo imune, proliferativa progressiva com deposição de imunoglobulinas e C3. Esta lesão é mais proeminente em fêmeas. Animais Balb/C *gld* de 5 meses de idade foram injetados com células mononucleares da medula óssea (1×10^6) via veia da cauda (200 μ L). O sacrifício foi realizado após um mês, e os rins foram avaliados morfológicamente para determinação da lesão glomerular (celularidade e expansão mesangial) e detecção de complexos imunes (IgG, IgM, IgA e C3) por imunofluorescência direta. A proteinúria/24 horas foi analisada pelo método colorimétrico. Após a terapia celular verificou-se diminuição significativa da proteinúria ($p < 0,05$) nos animais tratados (1.10 ± 0.29 vs 1.64 ± 0.28 g/L). Morfológicamente se observou uma melhora significativa da lesão glomerular (celularidade e expansão mesangial) com atenuação da deposição dos complexos imunes porém sem modificação significativa do nível sérico de anti-DNA e anti-histona (IgG e IgM). Estes resultados sugerem que células mononucleares de medula óssea foram capazes de atenuar as lesões renais, provavelmente pela modulação da reação imune induzida pelo aporte de células da medula óssea.

ABSTRACT

The system Fas-FasL is involved in the development of autoimmune diseases. Mutant ceapas of Fas (lpr) and FasL (gld) present a significant accumulation of T-lymphocytes CD4⁻/CD8⁻/B220⁺ at the lymph nodes causing a generalized lymphadenopathy and the production of high titles of self reactive antibodies and variable kidney damage, and is considered a animal model of systemic lupus erythematosus. The purpose of this study was to morphologically characterize the degree of kidney damage shown by Balb/C gld animals, and to evaluate the role of transplantation of bone marrow mononuclear cells in mitigating glomerular injury of those animals. Balb/C animals gld presented since 3 months of age a glomerulonephritis caused by complex immune, progressive proliferative with deposition of immunoglobulins and C3. This injury was more prominent in females. Balb/C gld animals, aged 5 months, were injected with bone marrow mononuclear cells (1×10^6) via tail vein (200 μ L). The sacrifice was carried out after one month, and the kidneys were morphologically evaluated to determine the glomerular injury (cellularity and mesangial expansion), and detection of immune complexes (IgG, IgM, IgA, and C3) by direct immunofluorescence. The 24-hour proteinuria was analysed by colorimetric method. After cellular therapy it was verified significant decrease in proteinuria ($p < 0.05$) in the treated animals (1.10 ± 0.29 vs. 1.64 ± 0.28 g/L). Morphologically it was observed a significant improvement in glomerular injury (cellularity and mesangial expansion) with attenuation of the immune complexes deposition but without significant change in the level of both anti-DNA serum and anti-histona serum (IgG and IgM). These results suggest that bone marrow mononuclear cells were able to mitigate the renal lesions, probably by modulation of the immune reaction induced by the intake of cells in the bone marrow.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1 <i>Histologia do Rim</i>	8
2.2 <i>Autoimunidade e auto-tolerância</i>	11
2.3 <i>Sistema FAS/FASL</i>	14
2.4 <i>Modelo animal</i>	19
2.5 <i>Terapia Celular</i>	21
3. OBJETIVOS	27
3.1 <i>Objetivo Principal</i>	27
3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	27
4. METODOLOGIA	28
4.1 <i>Caracterização da Lesão renal do Animal Balb/C gld</i>	28
4.2 <i>Protocolo da Experimentação</i>	28
4.3 <i>Protocolo de Obtenção e Isolamento das Células Mononucleares da Medula Óssea</i>	30
4.4 <i>Proteinúria de 24 horas</i>	31
4.5 <i>Obtenção e processamento das amostras de rim</i>	31
4.6 <i>Estudo Morfológico</i>	32
4.7 <i>Estudo histomorfométrico</i>	32
4.7.1 <i>Celularidade glomerular</i>	32
4.7.2 <i>Índice de expansão mesangial (densidade de superfície mesangial)</i>	33
4.7.3 <i>Estudo semi-quantitativo do mesângio/esclerose mesangial</i>	33
4.8 <i>Imunofluorescência Direta para detecção da deposição de IgM, IgA, IgG e C3</i>	33
4.9 <i>Dosagem de Imunoglobulinas (IgM e IgG) e anticorpos específicos (DNA de dupla fita e histona)</i>	34
4.10 <i>Análise estatística</i>	35
5 RESULTADOS	37
5.1 <i>Caracterização do modelo</i>	37
5.1.1 <i>Análise do número de células glomerulares</i>	40
5.1.2 <i>Índice de Expansão Mesangial (Densidade de superfície mesangial)</i>	41
5.1.3 <i>Análise de Imunofluorescência direta</i>	42
5.2 <i>Análise da proteinúria / 24hs dos grupos experimentais</i>	44
5.3 <i>Análise histopatológica dos grupos experimentais</i>	45
5.4 <i>Análise do número de células glomerulares dos grupos experimentais</i>	46
5.5 <i>Índice de Expansão Mesangial dos grupos experimentais</i>	47
5.6 <i>Análise da Imunofluorescência Direta dos grupos experimentais</i>	49
5.7 <i>Análise dos complexos imunes circulantes (IgM e IgG) dos grupos experimentais</i>	51
5.8 <i>Análise de anticorpos anti-DNA de dupla fita (IgM e IgG) dos grupos experimentais</i>	52
5.9 <i>Análise de anticorpos anti-histona (IgM e IgG) dos grupos experimentais</i> 53	
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE ABREVIATÖES

AICD	Morte celular induzida por ativação
ANOVA.....	Análise de Variância
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
ELISA.....	Teste imunoenzimático
FADD.....	Proteína adaptadora
FGFb.....	Fator de crescimento fibroblástico básico
FITC.....	Isotiocinato de fluoresceína
FLIPS.....	Proteínas inibitórias do FLICE
GFP.....	Proteína verde fluorescente
GLD.....	Doença linfoproliferativa generalizada
HSC.....	Células-tronco hematopoiéticas
IAP.....	Proteínas inibidoras da apoptose
ISN.....	Sociedade Internacional de Nefrologia
RPS.....	Sociedade de Patologia Renal
LES.....	Lúpus eritematoso sistêmico
LPR.....	Linfoproliferação
MHC.....	Complexo de histocompatibilidade
MOM.....	Células mononucleares da medulla óssea
MSC.....	Células-tronco mesenquimais
NCI.....	<i>National Cancer Institute</i>
RNA.....	Ácido ribonucleico
SP.....	Células <i>side population</i>
TNF.....	Fator de necrose tumoral

1. INTRODUÇÃO

A proteína Fas Ligante ou FasL (CD 95L) é uma proteína transmembranar do tipo II de 40kDa que pertence a família do fator de necrose tumoral (TNF) (SUDA e NAGATA, 1994). Como os outros membros desta família, o FasL é uma molécula homotrimérica, e sendo assim, cada FasL liga-se a três moléculas Fas. Devido à propensão dos domínios de morte se associarem uns aos outros, a ligação da proteína Fas, receptor do FasL, também denominada de APO-1 ou CD95, à molécula trimérica FasL leva ao agrupamento dos domínios de morte intracitoplasmáticos. FasL tem uma distribuição restrita nos órgãos estando presente em órgãos linfóides e algumas células de sítios de privilégio imune, onde FasL é expressa constitutivamente (LEE e FERGUSON, 2003). FasL induz morte celular por apoptose em células que expressam Fas (SUDA e cols., 1993), sendo que a via da apoptose mediada por FasL tem sido implicada na tolerância imunológica, lesão tecidual e manutenção dos sítios de privilégio imune (LYNCH e cols., 1993; LEE e FERGUSON, 1993; SABELKO-DOWNES e RUSSELL, 2000).

O papel pró-apoptótico do sistema Fas-FasL, também denominado de CD95/CD95L em células T, foi postulado baseado nas observações do desenvolvimento de doenças auto-imunes em 3 cepas de camundongos com mutações neste sistema (BIDERE e cols., 2006). Estes animais mutantes apresentam um acúmulo importante de linfócitos (primariamente células T CD4⁺/CD8⁻/B220⁺) e produção de altos títulos de anticorpos autoreativos, dentre outras alterações. A mutação gênica no camundongo *lpr* (do inglês *lymphoproliferation*) leva a uma expressão defeituosa de Fas. O animal *gld* (do inglês *generalized lymphoproliferative disorder*) expressa uma forma mutante de Fas-L e a terceira

cepa mutante, a *lpr*-símile (*lpr*^{cg}), exibe uma mutação pontual no domínio de morte do Fas que impede o recrutamento do FADD, a clivagem consecutiva de caspase-8 e a sinalização para apoptose (PETER e cols., 2007).

Camundongos homozigotos para o gene *lpr* ou *gld* apresentam espontaneamente uma doença autoimune sistêmica semelhante ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) humano, caracterizado pela produção de autoanticorpos, anti-DNA e fator reumatóide, hipergamaglobulinemia e deposição de complexos imunes nos glomérulos (COHEN e EISENBERG, 1991). Estes animais morrem geralmente no quinto mês de vida. As mutações *lpr* e *gld* não são alélicas e estão localizadas nos cromossomos 19 (ROTHS e cols., 1984; WATANABE e cols., 1991). A mutação *gld* originou-se em uma cepa *inbred* de camundongo C3H/HeJ (ROTHS e cols., 1984). Estes animais desenvolvem nos primeiros 3 a 5 meses de vida linfadenomegalia generalizada e esplenomegalia leve concomitantemente com hipergamaglobulinemia e altos níveis de IgG2a e de anti-DNA de dupla fita. Além disso, desenvolvem uma lesão renal pouco caracterizada mas com deposição de imunoglobulinas à semelhança do LES, mas com pouca manifestação clínica (COHEN e EISENBERG, 1991).

O LES é uma doença auto-imune com manifestações clínicas diversas e extremamente variáveis associada com envolvimento mucocutâneo, articular, renal, cardiovascular, gastrointestinal, hepático, pulmonar, hematológico, órgãos linfóides secundários e do sistema nervoso central (FIEHN e cols., 2003). A patogenia das manifestações clínicas se deve, em grande parte, à produção contínua de auto-anticorpos, sendo que são detectados no soro dos pacientes auto-anticorpos extremamente variados. Anticorpos dirigidos contra componentes nucleares são os principais auto-anticorpos, incluindo anticorpos contra DNA,

RNA, histonas e proteínas não histonas. Existem, ainda, anticorpos contra uma variedade de proteínas séricas, proteínas da matriz extracelular e antígenos celulares particularmente os de origem hematopoética. A agressão tecidual está associada à formação de complexos imunes constituídos por auto-antígenos e auto-anticorpos o que leva à ativação do complemento pela via clássica gerando mediadores inflamatórios e lesão tecidual (OATES e GILKESON, 2022; TANG, LUI, LAI, 2005; RIEMECASTEN e HAHN, 2005). Entretanto, a etiopatogenia do LES continua pouco elucidada apesar da extensa gama de conhecimentos disponíveis, o que levou ao reconhecimento de que a doença é multifatorial e que ambos, tanto fatores genéticos quanto ambientais, têm um papel crucial na sua patogênese.

Sabe-se que não existe um gene único envolvido na patogênese do LES e que a susceptibilidade envolve um certo número de genes e alelos em *loci* múltiplos, ainda não estando precisamente identificados os genes que controlam a susceptibilidade para o LES (SHIRAI & HIROSE, 2006).

O envolvimento de fatores ambientais adiciona ainda maior complexidade à doença. Sabe-se que a luz solar, frequentemente, causa o aparecimento de sintomas do LES, assim como infecções, *stress* emocional e que alguns fármacos causam uma doença semelhante ao LES. O metabolismo dos hormônios sexuais também explica pelo menos um dos mecanismos para a predominância do LES em mulheres. Certos fatores ambientais também podem alterar qualquer estágio da maturação de linfócitos autoreativos levando à desregulação do processo imunológico. Acredita-se que os fatores ambientais gerem a doença somente em indivíduos com uma gama particular de genes de susceptibilidade. Entretanto

ainda não está esclarecido como estes fatores ambientais interagem com os genes de susceptibilidade (SHIRAI e HIROSE, 2006).

A quebra da autotolerância é um dos defeitos imunológicos básicos do LES. A deleção central e periférica dos linfócitos autoreativos é um dos principais mecanismos que determinam a autotolerância e a imunidade inata na proteção contra autoimunidade. A primeira evidência da existência de um defeito da sinalização da apoptose no LES adveio do conhecimento de modelos murinos de LES. Animais nocauteados para o gene da DNase I (NAPIREI e cols., 2000), C1q (BOTTO M e cols., 1998) ou o componente P amiloide sérico (BICKERSTAFF e cols., 1999) apresentam os sintomas clássicos de LES incluindo a presença de anticorpos anti-nucleares e nefrite por complexo imune. Tanto a DNase I quanto as moléculas C1q e proteína amiloide P sérica estão envolvidas com o *clearance* de material apoptótico o que levou a suposição de que no lúpus há defeito tanto da apoptose quanto do mecanismo de *clearance* dos corpos apoptóticos (GAIPL e cols.,2005).

O envolvimento renal no LES é um protótipo de doença auto-imune. A nefrite lúpica é uma das maiores causas da morbidade e mortalidade no LES. Ela é altamente pleomórfica com respeito à expressão clínica e morfológica. As manifestações clínicas podem ocorrer durante qualquer fase da evolução da doença representadas desde micro-hematúria e proteinúria leves e assintomáticas até uma forma rapidamente progressiva de insuficiência renal (D´AGATI, 2007).

Morfologicamente a nefrite lúpica pode se manifestar como uma pequena deposição de complexos imunes no mesângio (classe II), uma glomerulonefrite proliferativa (classes III e IV), uma glomerulonefrite membranosa (classe V), ou mesmo se apresentar com aspecto misto (membranosa e proliferativa). Como o

tratamento da nefrite lúpica depende do tipo histológico, diversas classificações têm sido empregadas, sendo a mais recente a da Sociedade Internacional de Nefrologia e a da Sociedade de Patologia Renal (*ISN/RPS*). Embora existam vários protocolos terapêuticos para as diversas classes de nefrite lúpica, para as classes III a V que geralmente cursam com hematúria e proteinúria por vezes maciça (acima de 2 g /24 horas), tem sido utilizado terapia imunossupressiva com pulsoterapia (FIGURA 1).

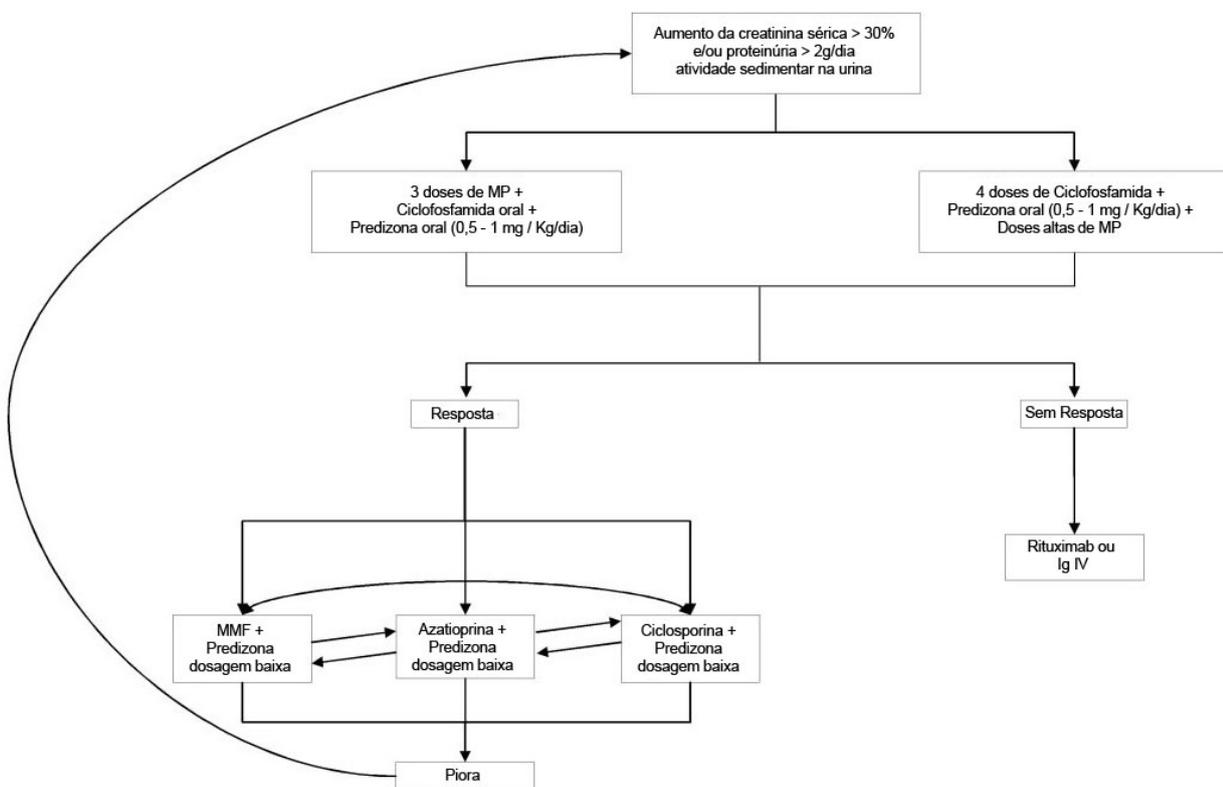


FIGURA 1 - Esquema terapêutico proposto por Ponticelli para o tratamento da nefrite lúpica com grave envolvimento renal na apresentação ou com remissões. Modificado de Ponticelli. C. New therapies for lúpus nephritis. Clin J Am Soc Nephrol, 2006;1: 863-868.

Apesar de, nos últimos anos, ter havido uma melhora no prognóstico de pacientes com nefrite lúpica com sobrevivência de 5 anos; em 50% dos pacientes na década de 50 (MERRELL e SHULMAN, 1955) e de 94% em 1994 (NOSSENT,

1999), aproximadamente 10 a 70% dos pacientes evolui para a doença renal terminal, necessitando de terapia substitutiva (diálise) ou transplante renal após 5 anos de sobrevida (GRUPPO ITALIANO PER LO STUDIO DELLA NEFRITE LUPICA - GISNEL-, 1992; DONADIO e cols., 1995 ; CONLON e cols., 1996; BAQI e cols., 1996; DOOLEY e cols., 1997; BONO e cols., 1999). A melhora do quadro clínico tem sido atribuída a inúmeros fatores incluindo a melhora no manejo dos imunossupressores, tratamento mais eficaz da doença cardiovascular e hipertensão e maior acesso à diálise e ao transplante renal (MACGOWAN, 1992). Entretanto, a mortalidade é de 1% ao ano considerando-se todos os pacientes com LES. Pacientes de alto risco apresentam mortalidade de 20% no primeiro ano, de 35% nos primeiros cinco anos e de 45% no décimo ano. Consideram-se pacientes de alto risco para complicações letais aqueles que apresentam doença renal, hipertensão, envolvimento pulmonar, anemia, trombocitopenia e anticorpos anti-fosfolípídeos ou doença com alto índice de atividade apesar da terapia (FRAENKEL, 1994; EISDALE, 1994; WARD, PYN, STUDENSKI, 1995; UROWITZ e cols., 1997). Para estes casos foi recomendado no Primeiro Simpósio Internacional de Terapia de Células Tronco Hematopoéticas em Doenças Auto-Imunes o uso de transplante de medula óssea (TYNDALL e GRATWOHL, 1997). A possibilidade de uso de células da medula óssea para os casos refratários/recorrentes (intratáveis) de LES já havia sido aventado desde 1993 (MARMONT, 1993). Desde então, ensaios clínicos com ou sem mieloablação associados a transplante autólogos de medula óssea, demonstraram a eficácia do uso da medula óssea no LES (TRAYNOR e BURT, 1999; TRAYNOR e cols., 2000; BRUNNER e cols., 2002; TRAYNOR e cols., 2002; STATKUTE e cols., 2005; BURT e cols., 2006). Apesar destes resultados terem sido obtidos em

ensaios clínicos com poucos pacientes (50 pacientes e seguimento clínico com média de 15 - 29 meses) foi observada remissão da doença pelo menos até o final do seguimento (STATKUTE e cols., 2005; BURT e cols., 2006). Para a doença renal, os exames laboratoriais mostraram estabilização. (BURT e cols., 2006) e melhora significativa dos testes imunológicos (STATKUTE e cols., 2005; BURT e cols., 2006). Já estão em andamento ensaios clínicos (fase III) para o tratamento do LES com transplante de medula óssea. Porém pouco ainda é conhecido acerca dos parâmetros morfológicos que são revertidos na nefrite lúpica com o transplante de medula óssea.

Tanto o camundongo *gld* que apresenta mutação de FasL, com fenótipo semelhante ao animal *lpr*, que apresenta mutação de Fas, desenvolvem doença autoimune com linfadenopatia generalizada, produção de autoanticorpos e lesão renal por complexo imune semelhante à nefrite lúpica humana. Os animais *gld* ainda são pouco caracterizados do ponto de vista morfológico, tendo sido verificado até o momento alterações do sistema imune, principalmente em animais com *background* genético C57/B6 e C3H. Nos animais com *background* Balb/C a lesão renal ainda não foi caracterizada. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a glomerulonefrite do animal *gld* e verificar o efeito do transplante de células mononucleares obtidas da medula óssea na evolução da lesão renal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histologia do Rim

O sistema urinário consiste de um par de rins, um par de ureteres, uma bexiga urinária e uma uretra. Macroscopicamente o rim possui uma córtex externa e uma região medular interna sendo que a medula é formada por massas cônicas, as pirâmides medulares, cujas bases se localizam na borda corticomedular. A pirâmide medular, junto com a região cortical adjacente, constitui um lobo renal. A região periférica de cada lobo renal são as colunas renais (de Bertin), estruturas residuais que representam a fusão de lobos primitivos dentro do blastema metanéfrico. O ápice de cada lobo renal termina em uma papila envolta por um cálice menor. Cada cálice menor coleta urina de uma papila. Os cálices menores convergem para formar os cálices maiores que, por sua vez, formam a pelve (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1999).

Cada rim possui 1,3 milhões de túbulos uriníferos envoltos por um estroma contendo tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Cada túbulo urinífero consiste de dois segmentos embriologicamente distintos que são: o néfron e o ducto coletor. O néfron consiste de dois componentes, o corpúsculo renal e um túbulo renal longo, formado pelas seguintes regiões: o túbulo contorcido proximal, alça de Henle e túbulo contorcido distal, que se esvazia no túbulo coletor.

O corpúsculo renal, ou corpúsculo de Malpighi consiste da cápsula de Bowman que reveste um tufo capilar, o glomérulo. A cápsula renal possui duas camadas, o folheto visceral e o folheto parietal, associado ao tecido conjuntivo do estroma. O folheto visceral é revestido por células epiteliais chamadas podócitos, reforçado por uma lâmina basal. Já o folheto parietal, é revestido por uma lâmina

basal que suporta um epitélio pavimentoso simples e é contínuo com epitélio cúbico simples do túbulo contorcido proximal.

O espaço urinário (espaço de Bowman) recebe o ultrafiltrado do plasma (urina primária) e está contido entre o folheto visceral e o parietal da cápsula. O ultrafiltrado do plasma contém traços de proteínas. O espaço urinário se continua com o lúmen do túbulo contorcido proximal no domínio urinário, passagem através da qual o ultrafiltrado do plasma flui para o túbulo contorcido proximal. O domínio oposto, o local de entrada e saída das arteríolas glomerulares aferente e eferente, é chamado de pólo vascular.

O glomérulo consiste de três componentes, que são, os capilares glomerulares, revestidos pelas células endoteliais fenestradas. O mesângio, formado pelas células mesangiais imersas em uma matriz mesangial e os podócitos, constituintes do folheto visceral da cápsula de Bowman.

Os podócitos possuem processos celulares ramificados e longos que envolvem completamente a superfície do capilar glomerular. Os podócitos e as células endoteliais fenestradas e suas lâminas basais correspondentes constituem a barreira de filtração glomerular. A lâmina basal das células endoteliais, intimamente associadas com a lâmina basal produzida pelos podócitos, contém colágeno do tipo IV, fibronectina, laminina e heparansulfato como proteínas maiores.

O mesângio é uma estrutura intraglomerular interposta entre os capilares glomerulares, constituído de dois componentes: as células mesangiais e a matriz mesangial. As células mesangiais que se agregam fora do glomérulo (células mesangiais extraglomerulares) no espaço limitado pela mácula densa e pelas arteríolas aferentes e eferentes. Elas são denominadas de pericitos

especializados, com características de células musculares lisas e de macrófagos. As células mesangiais são contráteis, fagocíticas, capazes de proliferação, sintetizam elementos da matriz extracelular e secretam substâncias biologicamente ativas (prostaglandinas e endotelinas). Participam indiretamente do processo de filtração glomerular. A membrana de filtração glomerular não envolve completamente os capilares. Imunoglobulinas e moléculas complementares, incapazes de atravessar a barreira de filtração, podem entrar na matriz mesangial. O acúmulo de complexos de imunoglobulinas na matriz induz a produção de citocinas pelas células mesangiais, que desencadeiam uma resposta imune levando a uma oclusão eventual do glomérulo (KIERSZENBAUM, 2004) (FIGURA 2 e 3).

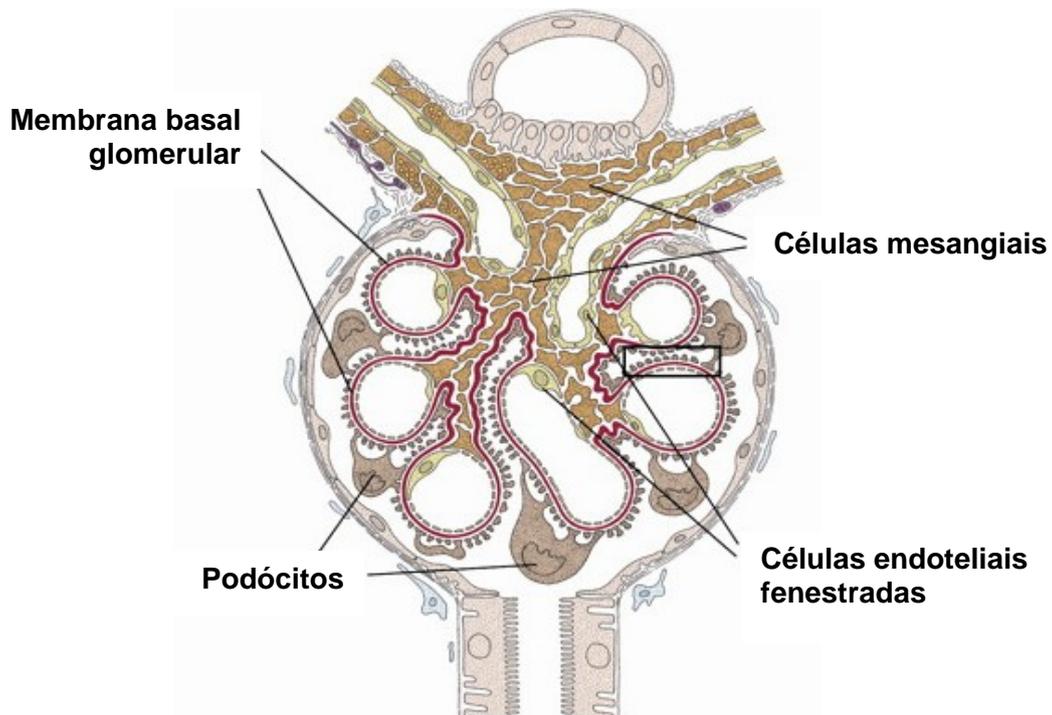


FIGURA 2 – Esquema do corpúsculo renal. Retirado de Sugimoto H. e cols. Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. PNAS, 2006; 103: 7321-7326.

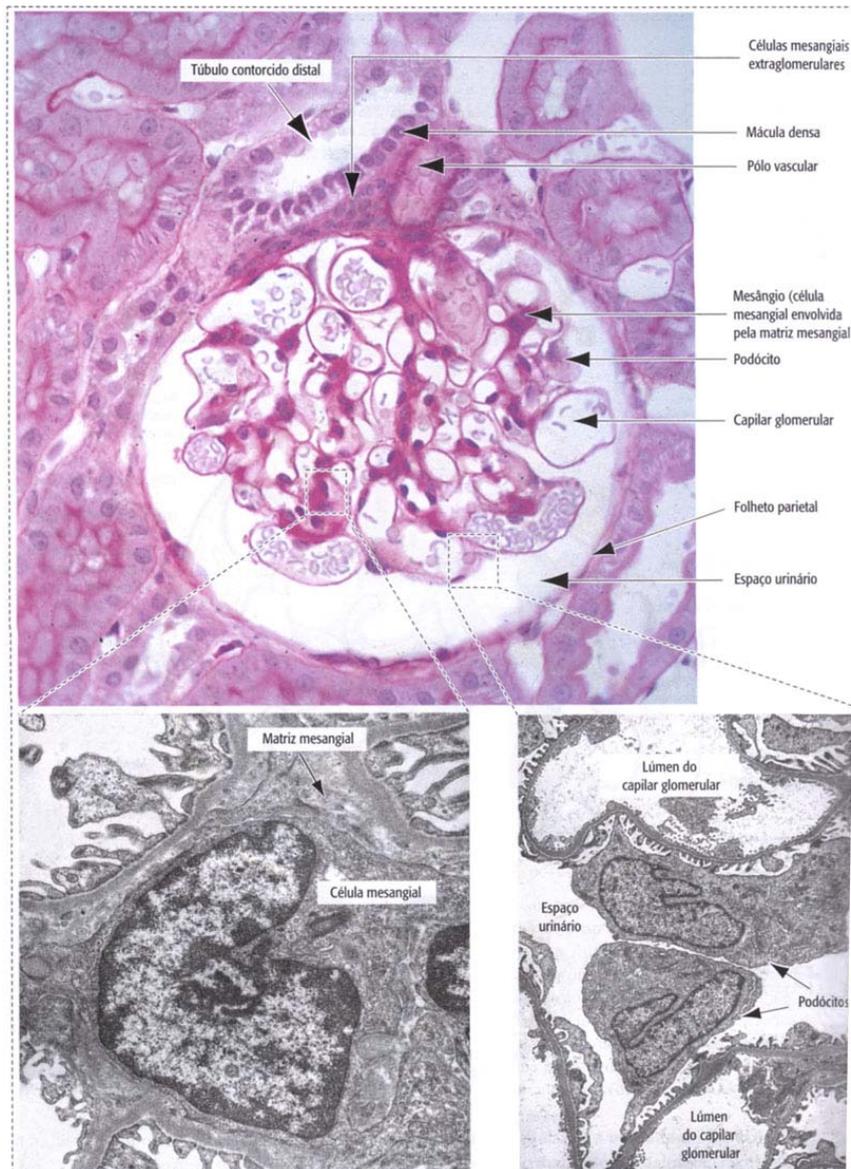


FIGURA 3 – Componentes do corpúsculo renal observados pela microscopia de luz e microscopia eletrônica. Retirado de Kierszenbaum. Histologia e biologia celular. Elsevier, 2004; 396-3967.

2.2 Autoimunidade e auto-tolerância

Todos os indivíduos são tolerantes para suas próprias substâncias potencialmente antigênicas sendo que a falha da auto-tolerância é a causa fundamental da autoimunidade. A auto-tolerância pode ser induzida nos órgãos linfóides primários como conseqüência de uma reação de linfócitos imaturos que reconhecem os antígenos próprios e é denominada de tolerância central. Já nos sítios periféricos, essa indução pode ocorrer como conseqüência de uma reação

de linfócitos maduros que encontram antígenos próprios em condições especiais, denominada de tolerância periférica. A tolerância central assegura que o repertório de linfócitos maduros não reconheça antígenos próprios amplamente disseminados nos órgãos linfóides primários. É o mecanismo responsável pela eliminação de linfócitos auto-reativos do repertório de linfócitos maduros. Tais linfócitos auto-reativos poderiam causar auto-reatividade através da discriminação do próprio como não-próprio. A tolerância aos antígenos que são específicos para os tecidos é mantida pelos mecanismos de tolerância periférica (ABBAS e LICHTMANN, 2005).

A autoimunidade resulta de uma falha nos mecanismos normalmente responsáveis pela manutenção da auto-tolerância dos linfócitos B, linfócitos T ou ambos. A tolerância aos antígenos próprios normalmente é mantida por processos de seleção que impedem a maturação de alguns linfócitos específicos para antígenos próprios e por mecanismos que inativam ou deletam linfócitos auto-reativos que amadurecem. A perda da tolerância pode resultar de seleção ou regulação anormal dos linfócitos autoreativos e por anormalidades na forma de apresentação dos antígenos próprios ao sistema imune (ABBAS e LICHTMANN, 2005). Os principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento da autoimunidade são a susceptibilidade genética e os desencadeantes ambientais como as infecções. Como a maioria das doenças autoimunes é poligênica, os indivíduos afetados herdam múltiplos polimorfismos genéticos que contribuem para a susceptibilidade à doença (RIOUX e ABBAS, 2005) (FIGURA 4).

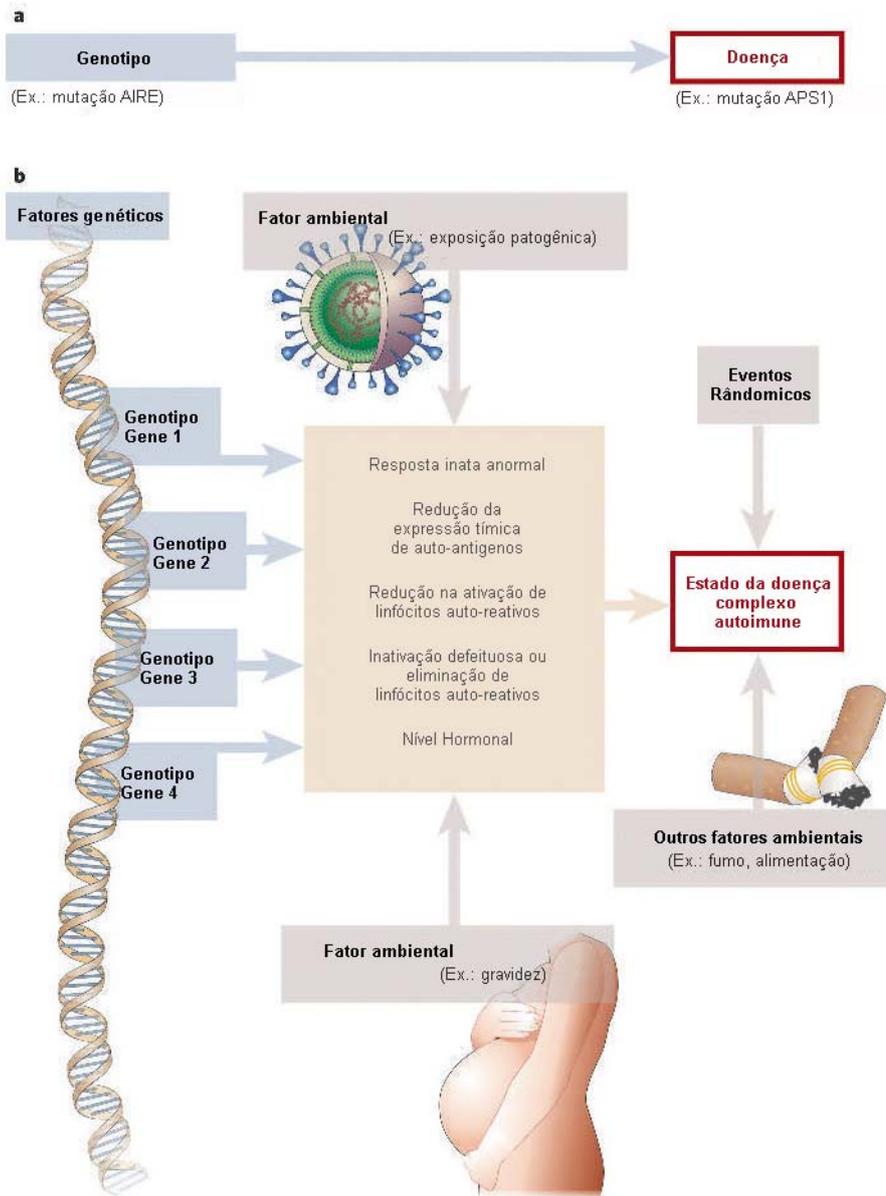


FIGURA 4. Modelo da patogênese das doenças autoimunes. (a) Alteração em um único gene. (b) Doença poligênica. Modificado de Rioux & Abbas. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. Nature, 2005; Jun 2: 584-589.

Os principais mecanismos de tolerância de linfócitos são a indução de morte celular por apoptose denominada de eliminação clonal (deleção); a inativação funcional sem a morte celular denominada de anergia e a supressão da ativação e função efetora dos linfócitos por linfócitos regulatórios. A tolerância central é obtida principalmente através da deleção clonal enquanto que, para a periférica, há a contribuição dos três mecanismos (ABBAS e LICHTMANN, 2005).

2.3 Sistema FAS/FASL

A proteína Fas, molécula glicosilada da superfície celular, com massa molecular relativa de cerca de 45 000 a 52 000 kD (335 resíduos de aminoácidos) pertence à superfamília do receptor de TNF/NGF. Esta superfamília de receptores de morte contém um domínio de morte intracelular essencial para a tradução do sinal apoptótico (SCHULZE-OSTHOFF e cols., 1998). Os receptores de morte são ativados por seus ligantes naturais pertencentes à família do TNF. São em geral proteínas transmembranares sendo convertidos em uma forma solúvel pela atividade de metaloproteases. Para o Fas-L foi verificado que tanto a forma solúvel quanto a forma ligada a membrana tem atividade (SUDA e cols., 1997; SCHNEIDER e cols., 1998 KRAMMER, 1999) e que a ligação da forma solúvel com a matriz extracelular aumenta sua atividade (AOKI e cols., 2001). Apesar da expressão de Fas ser abundante na superfície celular, as células freqüentemente são resistentes ao FasL, indicando que a via de sinalização intracelular pode ser bloqueada. A apoptose induzida pela via Fas/FasL pode ser bloqueada pela endocitose dos receptores, pelo FasL solúvel durante a transdução do sinal, pelas FLIPS (proteínas inibitórias do FLICE), no estágio efetor pela CrmA (*cytokine response modifier A*), por p35 ou por caspases inibidoras da apoptose (IAPs), (TSCHOPP e cols., 1998) (FIGURA 5).

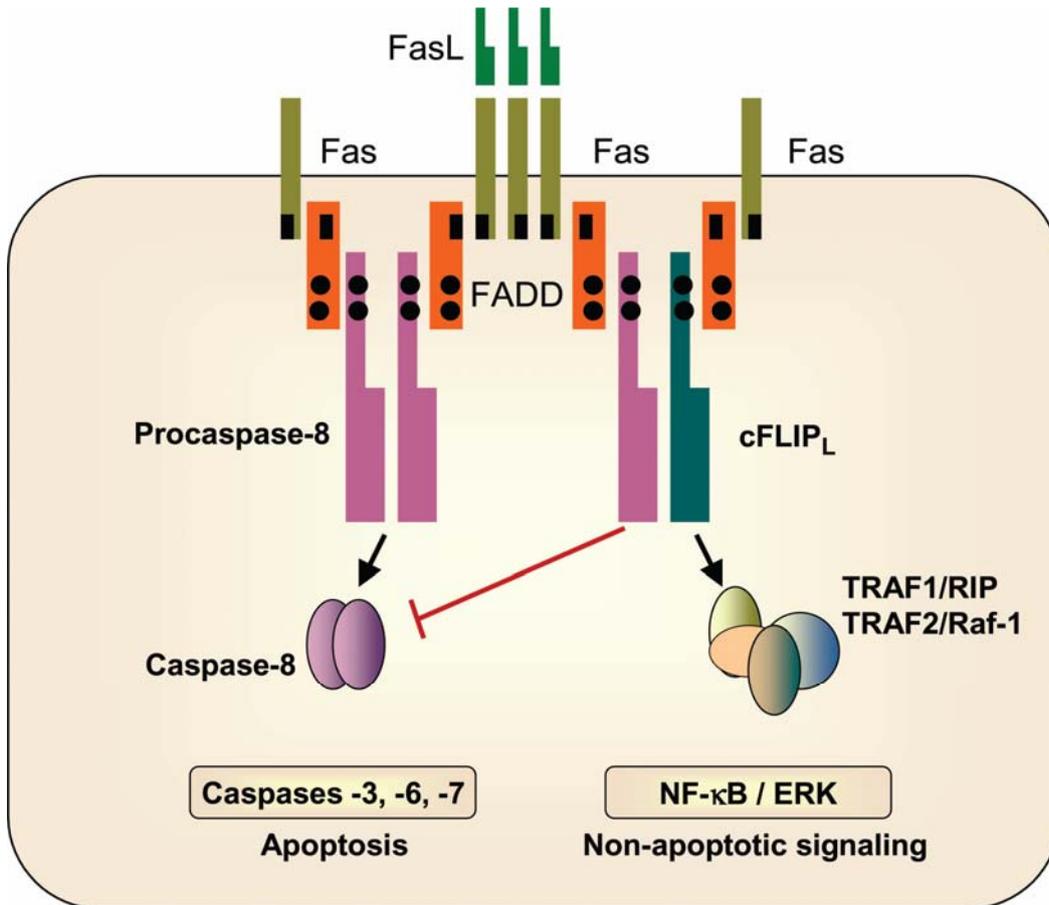


FIGURA 5. Esquema representativo da apoptose induzida pela via Fas/FasL. Retirado de Lee HO e cols. *Biology of FasL. Cytokine & Growth Factor Rev*, 2003; Jun-Aug;14 (3-4) 325–335.

Fas é constitutivamente expressa em células T enquanto que FasL só está expressa nas células T ativadas. FasL é restrita a poucos tipos celulares tais como células T, macrófagos e células de tecidos imunologicamente privilegiados como o testículo e olhos. Foi proposto que Fas-L protege estes tecidos por induzir a morte de células T citotóxicas, Fas sensíveis, que infiltram estas zonas. A ligação de FasL com Fas resulta em apoptose que é responsável pela manutenção da tolerância periférica e para o término de resposta imune (KRAMMER, 1999; KRAMMER, 2000).

As células T maduras têm pelo menos duas vias apoptóticas (LENARDO, 1996; VAN PARIJS e ABBAS, 1996). A primeira, que envolve o sistema Fas/FasL,

denominada morte induzida por ativação-AICD (*activation-induced cell death*) é uma morte ativa, direcionada por antígenos, onde receptores de morte da membrana plasmática são mobilizados. A outra forma de morte celular, a morte passiva ou por negligência independe de Fas/FasL e ocorre ao término da resposta imune. Ela está relacionada à privação de estímulos de sobrevivência tais como fatores de crescimento ou co-estimuladores, o que provoca rápido aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol (VAN PARIJS e ABBAS, 1996). As duas formas de morte celular possuem bases moleculares distintas. A morte por negligência pode ser inibida por moléculas da família do Bcl-2 como Bcl-2 ou o Bcl-x. O mesmo não é observado em relação a AICD já que citocinas como interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-7 (IL-7), interleucina-13 (IL-13) e interleucina-15 (IL-15) (AKBAR e cols.,1996; BOISE e THOMPSON, 1996; LORENZ e cols.,1997; SALMON e cols.,1997), e sinais co-estimulatórios, como a ligação da molécula CD28 em moléculas B7 (CD80 e CD86) (BOISE e cols.,1995; LAGRESLE e cols.,1996) permitem a manutenção da expressão destas proteínas. Por outro lado, à medida que o antígeno é eliminado, a disponibilidade de citocinas e de sinais co-estimulatórios diminuem (VAN PARIJS e ABBAS, 1996). Neste ambiente competitivo, poucas células conseguem escapar da morte; os linfócitos persistentes são aqueles componentes da população de memória imunológica (AKBAR e SALMON, 1997; VAN PARIJS e ABBAS, 1998).

O sistema Fas/FasL está envolvido no processo apoptótico que ocorre durante a maturação das células T. As células precursoras de células T se originam na medula óssea e migram para o timo onde elas se tornam maduras e sofrem seleção negativa ou positiva para produzir células T positivas CD4+ ou

CD8+ (PALMER, 2003). A seleção negativa deleta potencialmente timócitos auto-reativos potenciais gerando um repertório de células T periféricas autotolerantes (SPRENT e KISHIMOTO, 2001; STARR e cols., 2003). Durante este processo as células T precursoras morrem por apoptose em vários estágios de seu desenvolvimento. As células precursoras que expressam receptor de célula T (TCR) que interagem com o complexo de histocompatibilidade (MHC) próprio, expresso no epitélio tímico são selecionadas (seleção positiva) enquanto que aquelas que não podem interagir com o MHC próprio morrem por apoptose (VON BOEHMER, 1994). Por outro lado, as células precursoras que interagem fortemente com antígenos complexados ao MHC são mortas por seleção negativa (NOSSAL, 1994). Mais de 95% das células T precursoras que migram para o timo morrem neste órgão sendo que somente 5% delas emigram para a periferia como células T maduras (SCOLLAY e cols., 1980; EGERTON e cols., 1990).

O sistema Fas/FasL é também um dos responsáveis pelo início da apoptose nas células T periféricas. A interação do Fas com seu ligante desencadeia uma série de eventos intra-celulares. Os domínios de morte se acoplam com as proteínas adaptadoras que iniciam a ativação de caspases através dos domínios efetores de morte resultando em morte celular (PALMER, 2003). No sistema imune a morte de células Fas positivas por apoptose contribui para as funções citolíticas efetoras e para o término das respostas imunes específicas através da morte celular induzida pela ativação (GREEN e SCOTT, 1994; RUSSELL, 1995). Além disso existem evidências de que a via FAS não é a única via requerida para a deleção dos timócitos autoreativos embora sob condições com altas concentrações de antígeno, a expressão de Fas aumenta a

eficiência da seleção negativa (KISHIMOTO e cols., 1998; SPRANT e KISHIMOTO, 2002) (FIGURA 6).

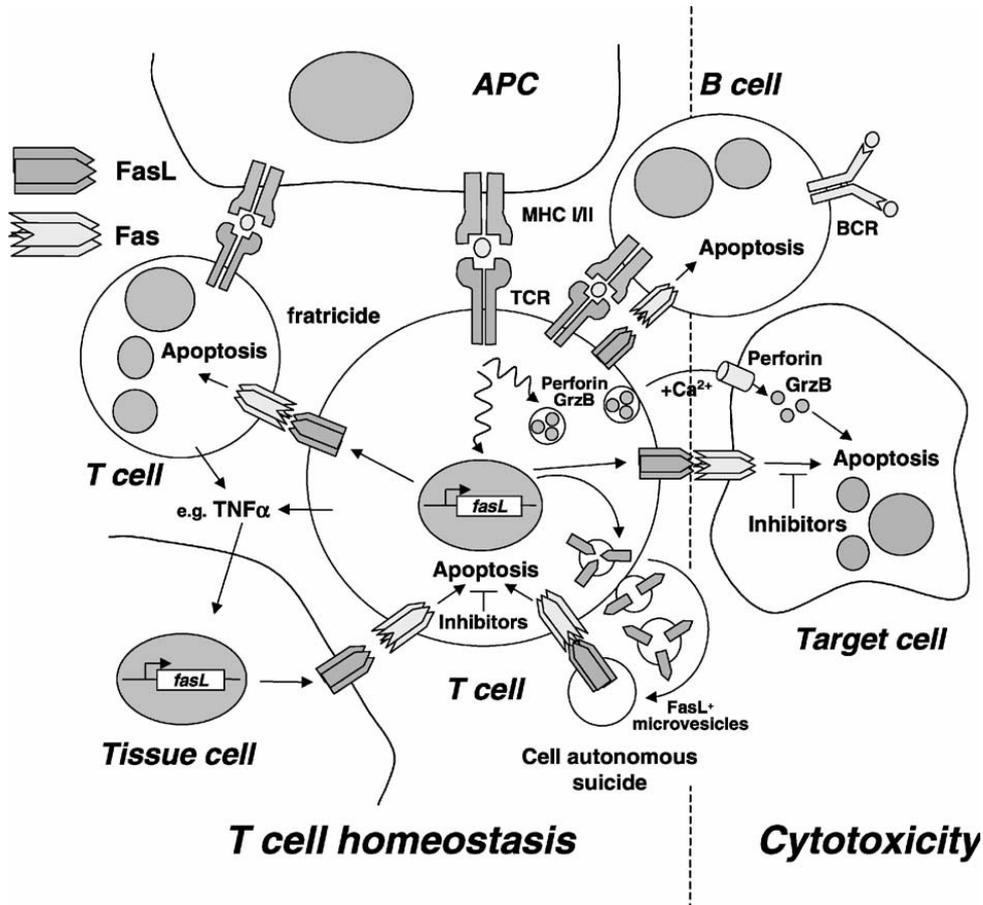


FIGURA 6 – Esquema representativo da via Fas/FasL para deleção de linfócitos. Retirados de Matiba B. The CD95 system and the death of a lymphocyte. Seminars in Immunology, 1997; 9: 59-68.

A estimulação antigênica de células T cronicamente ativadas induz a expressão de FasL, resultando em fratricídio entre linfócitos, um importante mecanismo de imunoregulação, que elimina preferencialmente células T CD4⁺ e linfócitos B ativados no final da resposta imune (VAN PARIJS e ABBAS, 1996). Linfócitos ativados são inicialmente refratários aos efeitos da ligação Fas-FasL e o aumento da susceptibilidade à indução de apoptose via Fas-FasL está

associada ao encontro com o antígeno, o que garante a correta expansão da população linfocitária no sítio inflamatório (BOISE e THOMPSON, 1996).

2.4 Modelo animal

Os trabalhos de BIELSCHOWSKY e colaboradores (1959) relatam a história natural da doença auto-imune em camundongos NZB. Estudos posteriores de HELYER e HOWIE (1963) demonstraram a ocorrência de uma forma de glomerulonefrite, semelhante a observada no LES, em prole de animais híbridos de NZB X NZW. Esses achados permitiram um melhor conhecimento sobre fatores genéticos e imunológicos envolvidos na patogênese do lúpus sistêmico murino (HOWIE e HELYER, 1963; MILICH e GERSHWIN, 1981). Os animais NZB apresentam múltiplas alterações em linfócitos T e B tendo sido identificados poucos *loci* de segregação independente que influenciam a expressão de cada uma das modificações (ROTHS e cols., 1984).

Com o surgimento de cepas de camundongos apresentando linfoproliferação associada à mutação recessiva autossômica do gene *lpr* (MURPHY e ROTHS, 1977), do gene *gld* (ROTHS e cols., 1984) e o fator de aceleração auto-imune associado ao cromossoma Y em camundongos BXSB/Mp (MURPHY e ROTH, 1979) foi possível estudar o efeito de genes únicos nas doenças auto-imunes.

Os genes *lpr* (de linfoproliferação) e *gld* (de doença linfoproliferativa generalizada) são mutações autossômicas recessivas, espontâneas, dos genes de Fas ou do FasL, respectivamente. Nestes animais há a indução da produção de auto-anticorpos e linfadenopatia devido ao acúmulo de células T duplo negativas CD4⁺/CD8⁻ em várias cepas de camundongos. Estas mutações também

causam várias doenças auto-imunes em combinação com certos *background genes*. A doença mais grave ocorre no camundongo da cepa MRL que desenvolvem auto-anticorpos anti-DNA e nefrite auto-imune mesmo sem a presença de mutação em *lpr* (ROTHS e cols., 1984). Camundongos MRL-*lpr/lpr* exibem altos níveis de auto-anticorpos incluindo anti-DNA, anti-Sm, fator reumatóide, nefrite auto-imune, vasculite e artrite, sendo que metade dos animais morrem em torno do 5º mês de vida. O início da doença auto-imune apresenta-se de maneira acelerada nestes animais e há o aparecimento do fenótipo de linfoproliferação (KELLEY e ROTHs, 1985). Na periferia as células T maduras também sofrem seleção: aquelas que reconhecem antígenos próprios são inicialmente ativadas e morrem por apoptose (deleção clonal periférica) (WEBB e cols., 1990).

A mutação *gld* surgiu na cepa *inbred* de camundongos C3H/HeJ (ROTHS e cols., 1984). O fenótipo de camundongos C3H/*gld* não difere dos animais C3H/*lpr* sugerindo que os dois tipos de mutações afetam as mesmas vias da diferenciação dos linfócitos. Entretanto, *lpr* e *gld* não são alélicos e não se complementam, de forma que os duplo-heterozigotos são completamente normais (SELDIN e cols., 1988). Os aspectos clínicos do fenótipo *gld* reproduzem aqueles presentes nos animais C3H/*lpr* (ROTHS e cols., 1984). Os animais C3H-*gld* apresentam linfadenopatia generalizada e esplenomegalia leve nos primeiros três a cinco meses de vida concomitantemente com hipergamaglobulinemia e altos níveis de IgG2 e anticorpos anti-nucleares incluindo anticorpos anti-DNA de dupla fita. A anemia está presente em cerca de 50% dos animais assim como linfocitose e eosinofilia. Os linfonodos têm aspecto reacional com proliferação de linfócitos, histiócitos, plasmócitos além de fibrose. No rim apresentam deposição mesangial

de imunoglobulinas sem sinais clínicos de nefrite. Apesar da intensa linfoproliferação os animais não desenvolvem neoplasias nem espontaneamente e nem após transplante (ROTHS e cols., 1984). O fenótipo das células T de animais *gld* é semelhante ao do animal *lpr*. A maioria das células são CD4⁻, CD8⁻, CD2⁻, IL2R⁻, Ly22⁺, Ly24⁺. Estas células T apresentam vários sítios de ligação para lectinas normalmente vistas em células B (COHEN e EISENBERG, 1991). Sob o ponto de vista funcional são hipo-responsivas tanto em culturas mistas de linfócitos quanto no teste de proliferação direta da concanavalina A (DAVIDSON e cols., 1985; YUI e cols., 1988). No rim, além da deposição de imunoglobulinas ocorre infiltração linfocitária nos espaços perivasculares (ROTHS e cols., 1984).

Até o momento existem poucos relatos sobre a patologia renal de animais *gld* com *background* Balb/c. ROTHS e cols. (1984) verificaram que apenas 14% dos animais apresentava doença renal semelhante à nefrite lúpica, sendo que em 54% dos animais as lesões eram focais ou ausentes. A presença de complexos imunes, detectados por técnica de imunofluorescência direta em animais com idade entre 8 e 41 semanas demonstrou que, a partir da 22^a semana, ocorre deposição de complexos imunes no mesângio.

2.5 Terapia Celular

O uso terapêutico de células-tronco adultas para o tratamento de doenças crônico-degenerativas pode ser potencialmente eficaz tanto em modelos animais como em humanos. Até o momento, diversos trabalhos desenvolvidos em animais e em humanos demonstraram que células-tronco adultas obtidas na medula óssea são capazes de contribuir para a regeneração de vários tipos de tecidos não hematopoéticos como músculo esquelético (BRAZELTON e cols., 2003;

CAMARGO e cols., 2003), endotélio (XU, 2007; GOLLEDGE e cols., 2007), fígado (LAGASSE e cols., 2000), trato digestivo e respiratório (OKAMOTO e cols., 2006; LOEBINGER e JANES, 2007) rim (SUGIMOTO e cols., 2006), neurônios (MEZEY e cols., 2000; WEIMANN e cols., 2003) e cardiomiócitos (TOMITA e cols., 1999; ORLIC e cols., 2001).

As células-tronco adultas estão presentes na maioria dos tecidos que se auto-renovam como pele, trato intestinal e sistema hematopoiético. Na medula óssea, coabitam dois sistemas de células-tronco: as células-tronco hematopoéticas (HSC ou *hematopoietic stem cell*) e as células-tronco mesenquimais (MSC ou *mesenchymal stem cell*). Apesar das HSC estarem envolvidas primariamente com a formação das células sanguíneas elas apresentam uma grande plasticidade, podendo originar células do trato gastrointestinal, da pele, do fígado e do pulmão (KRAUS e cols., 2001).

O ensaio clássico para a caracterização das HSCs de murinos mostra ser capaz de reconstituir, a longo prazo, todas as linhagens de células sanguíneas após transplante em receptores letalmente irradiados. As HSCs da medula óssea não expressam marcadores de superfície normalmente presentes nas células hematopoéticas comprometidas mas exibem altos níveis do antígeno de célula-tronco 1 (sca-1) e KIT. Esta sub-população $Lin^{-}sca-1^{+}KIT^{+}$, constitui 0,5% da medula óssea e contém um grupo de células $CD34^{-}FLT3^{-}CD150^{+}$ com atividade de reconstituição a longo prazo e outra $CD34^{+}FLT3^{-}$ com capacidade de auto-renovação limitada. Existem evidências de que uma única célula-tronco, $Lin^{-}sca-1^{+}KIT^{+}$ é capaz de reconstituir todas as linhagens hematopoéticas (WILSON e TRUMP, 2006). Além disso, há uma subpopulação das HSCs com capacidade de reconstituição a longo prazo, capazes de promover a liberação ativa do corante de

DNA Hoeschst 33342. Esta propriedade é utilizada para o seu isolamento e identifica uma subpopulação denominada de *side population* (SP) (GOODELL e cols., 2005). Além da medula óssea as SPCs são encontradas em muitos outros tecidos que contêm células-tronco tecido-específico e em diversas espécies animais como camundongos, porcos, macacos e humanos. Todos esses estudos sugerem uma íntima associação entre o fenótipo SP com a funcionalidade das células-tronco adultas (ASAKURA e RUDNICKI, 2002). Quando injetadas em camundongos mielo-depletados este tipo celular é capaz de formar hepatócitos, miócitos esqueléticos e células das linhagens hematopoéticas (MOLLURA e cols., 2003).

As MSCs estão presentes no estroma da medula óssea, imersas na matriz extracelular. São células aderentes *in vitro*, tem aspecto fibroblastóide e são capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares. As MSCs são células pluripotentes com potencial de diferenciação em multi-linhagens (ectoderma, endoderma e mesoderma). Elas foram identificadas em várias espécies animais incluindo humanos, roedores e primatas e em tecidos extra-medulares como tecido adiposo, folículos pilosos, tecido subcutâneo do couro cabeludo e ligamento periodontal e ainda em tecidos pré-natais como placenta e cordão umbilical (KAMPREERA e cols., 2006). Em camundongos adultos as MSC estão presentes em quase todos os tecidos e órgãos tais como cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, medula óssea, músculo esquelético, timo e pâncreas (MEIRELLES e cols., 2006). A presença destas células em organismos adultos sugere que elas tenham um papel de reservatório para a remodelação tecidual. Alguns fatores tais como o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-b) ou o fator de crescimento semelhante ao fator de crescimento ligante de heparina podem, além de aumentar

a taxa de proliferação das MSCs, interferir com seu processo de diferenciação, ao mantê-las no seu estado de multipotência (KAMPRERA e cols., 2005). À semelhança das HSC já foi demonstrado a presença de MSC circulantes sugerindo que os compartimentos de tecido mesenquimal podem ser renovados pelas MSCs presentes no sangue periférico (ROUFOSSE e cols., 2004). Não existe, até o momento, marcadores específicos para as MSCs. Elas são reconhecidas pela ausência de marcadores de HSC, tais como CD45 e CD34, ausência de marcadores endoteliais (CD31 ou PECAM-1) e expressão de uma série de moléculas de superfície tais como CD105, CD73, CD106, CD54, CD44, CD90, CD29 e STRO-1. Outros marcadores como receptores de citocinas, moléculas envolvidas nas respostas imunes (MHC de classe I e II, CD119/receptor de interferon γ) e quimiocinas podem ser expressas pelas MSCs. Baixos níveis de marcadores também expressos por células neurais (nestina), endoteliais (CD106) e epiteliais (receptor-1 do fator de crescimento epidérmico humano) estão também presentes nas MSCs (KAMPRERA e cols., 2006). Além da capacidade regenerativa, as MSCs também possuem propriedades imunoregulatórias: elas suprimem as reações imunológicas tanto *in vitro* quanto *in vivo* de forma não-MHC restrita (LE BLANC e cols., 2003; KAMPRERA e cols., 2005).

Em condições particulares, tais como na ausência do timo ou após transplante de HSCs, foi descrita a existência de interações funcionais entre MSCs da medula óssea e linfócitos T. Em camundongos timectomizados a maioria das células T aderentes ao estroma da medula óssea exibem fenótipo imaturo indicando que o microambiente da medula óssea cria um suporte adequado para o desenvolvimento das células T. Após o transplante de HSCs em humanos foi

verificado que as MSCs da medula óssea migram para o timo onde elas participam na seleção positiva de timócitos. Além disso, as MSCs derivadas da medula óssea de camundongos promovem a regulação negativa da resposta de células T virgens e de memória antígeno-específica para seu peptídeo cognato. Elas também induzem o aumento significativo da sobrevivência de transplantes de pele MHC-*mismatched*, reduzem a incidência de rejeição da doença do enxerto versus hospedeiro após transplante alogeneico de HSCs em humanos e levam a melhora efetiva da encefalomielite auto-imune experimental em camundongos. Além disso, as MSCs podem ainda inibir a atividade de quase todas as células que participam da resposta imune ao suprimir as funções das células B, das células *natural killer* e a diferenciação e função de células dendríticas derivadas de monócitos (KAMPREIRA e cols., 2006).

Já está bem documentado que células da medula óssea contribuem para a manutenção e reparo dos diferentes compartimentos do rim incluindo o endotélio (ROOKMAAKER e cols., 2003; IKARASHI e cols., 2005; LI e cols., 2006), mesângio (ITO e cols., 2001; IMASAWA e cols., 2001; MASUYA e cols., 2003) e o compartimento túbulo-intersticial (POULSOM e cols., 2001; LIN e cols., 2002; MORIGI e cols., 2003; FANG e cols., 2005). Entretanto, nos diferentes experimentos realizados, independente do tipo celular que foi utilizado foi demonstrado uma baixa frequência de incorporação tecidual das células derivadas da medula óssea, motivando o questionamento da plasticidade das células adultas da medula óssea e sua relevância fisiológica nesse sistema. Dois estudos em pacientes com transplante renal corroboram estes resultados. No primeiro foi observado que apenas 0,6 – 6,8% das células tubulares eram provenientes do

doador (POULSOM e cols., 2001) e no outro, que somente 1% dos túbulos apresentavam células do doador (GUPTA e cols., 2002).

DUFFIELD e colaboradores (2005) estudaram a reparação renal no modelo de isquemia-reperusão em camundongos quiméricos expressando a proteína verde fluorescente - GFP (*green fluorescent protein*) ou β -galactosidase ou o cromossoma Y exclusivamente em células derivadas da medula óssea. Os autores verificaram que células da medula óssea transplantadas neste modelo não contribuem diretamente para a regeneração renal. Elas teriam uma pequena participação na repopulação do endotélio vascular o que poderia contribuir indiretamente para a melhora da isquemia destes animais.

LIN e colaboradores (2005) no modelo de isquemia- reperusão renal, em camundongos transgênicos que expressam a proteína *GFP*. Demonstraram que após o transplante de células derivadas da medula óssea, realizado duas horas depois da agressão renal, elas começam a surgir no rim após dois dias, primeiramente no interstício e glomérulos e após sete dias nos túbulos, perfazendo neste compartimento somente cerca de 1% das células tubulares e portanto tendo uma pequena contribuição para a regeneração tubular (LIN, MORAN, IGARASHI, 2005).

Este trabalho tem como objetivo verificar a capacidade de células mononucleares obtidas da medula óssea atuar no reparo da lesão renal de animais Balb/c *gld* (glomerulonefrite proliferativa), construindo duas hipóteses:

Hipótese substantiva: *há influência positiva das células da medula óssea na glomerulonefrite proliferativa.*

Hipótese nula: *não há influência positiva das células da medula óssea na glomerulonefrite proliferativa.*

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Este projeto tem como objetivo principal avaliar o efeito do transplante de células mononucleares da medula óssea sobre a evolução das lesões renais em camundongos Balb/c *gld*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o nível de proteinúria desenvolvido pelos animais Balb/c *gld* antes e após a injeção de células mononucleares da medula óssea autólogas;
- Avaliar morfológicamente a lesão renal desenvolvida pelos animais Balb/c *gld* antes e após a injeção de células mononucleares da medula óssea autólogas.
- Avaliar semi-quantitativamente e por histomorfometria a lesão glomerular desenvolvida pelos animais Balb/c *gld* antes e após a injeção de células mononucleares da medula óssea autólogas.
- Avaliar por imunofluorescência direta a deposição de imunoglobulinas A, M e G e a fração 3 do complemento nos rins de animais Balb/c *gld* após a injeção de células mononucleares da medula óssea autólogas.
- Avaliar quantitativamente o nível de complexos imunes circulantes (IgM e IgG) em animais Balb/c *gld* e após a injeção de células mononucleares da medula óssea autóloga;
- Avaliar quantitativamente o nível de anticorpos contra DNA de dupla fita (IgM e IgG) em animais Balb/c *gld* e após a injeção de células mononucleares da medula óssea autólogas;
- Avaliar quantitativamente o nível de anticorpos anti-histona (IgM e IgG) em animais Balb/c *gld* e após a injeção de células mononucleares da medula óssea autóloga.

4. METODOLOGIA

Todos os procedimentos que envolveram a manipulação animal foram executadas de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1991).

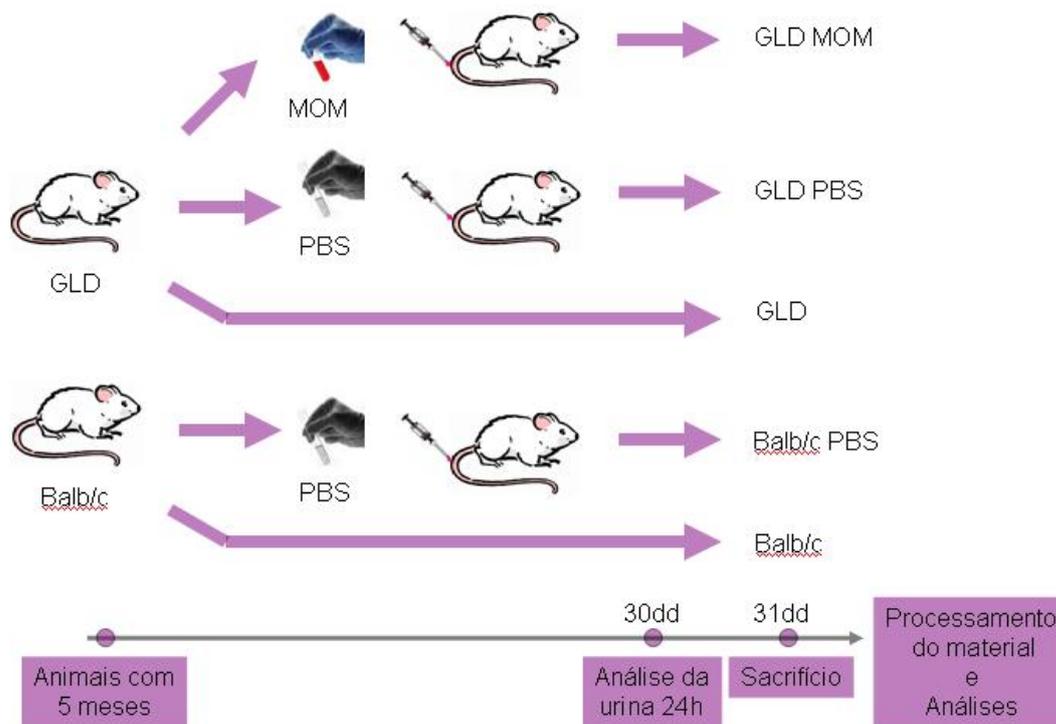
4.1. Caracterização da Lesão renal do Animal Balb/C *gld*

Os camundongos Balb/C e Balb/C *gld* foram gentilmente cedidos pelo Instituto Oswaldo Cruz – CECAL. No estudo foram utilizados animais de ambos os sexos com idades de 3, 5 e 7 meses num total de 10 animais/grupo. Sob efeito de anestesia com quetamina (35 mg/kg) e xilazina (9 mg/kg) os animais foram submetidos à perfusão vascular com 500 ml de salina (NaCl a 0.9%) acrescida de 5.000 U de heparina. A perfusão foi realizada com *scalp* número 23G (Med Vein) posicionado no ventrículo esquerdo. Após 20 minutos de perfusão os rins foram retirados e cortados longitudinalmente, sendo uma metade fixada em solução de Gendre por 4 horas e posteriormente, em formaldeído a 10% tamponado, por 12 horas. Estas amostras foram desidratadas em soluções de etanol a 70%, 95% e 100%; clarificadas em dois banhos de xilol e embebidas em parafina. A outra metade do rim foi congelada em resina OCT-*Tissue TEK* (Miles, CA, USA), e mantida na temperatura de -70°C para ser utilizada posteriormente no ensaio de imunofluorescência direta, descrito abaixo.

4.2. Protocolo da Experimentação

Camundongos Balb/c e Balb/c *gld* fêmeas, com idades de 5 meses, pesando 25-40g fornecidos pelo Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia, em

condições sanitárias adequadas (sala com temperatura e umidade controladas). Os animais receberam ração balanceada comercial (Purina) e água *ad libitum*. Após um período de aclimação de 2 semanas os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos com 4 animais cada:



1. Animais **Balb/c *gld*** com 5 meses submetidos ao transplante de células mononucleares da medula óssea (MOM) – GLD MOM;
2. Animais **Balb/c *gld*** com 5 meses que receberam somente injeção do veículo (PBS) – GLD PBS;
3. Animais **Balb/c *gld*** com 5 meses que não sofreram qualquer tipo de tratamento – GLD;
4. Animais **Balb/c** com 5 meses que receberam somente injeção do veículo (PBS) – Balb/c PBS;
5. Animais **Balb/c** com 5 meses que não sofreram qualquer tipo de tratamento – Balb/c.

Os animais teste (GLD MOM) foram sacrificados 30 dias após a injeção das células mononucleares da medula óssea, quando os mesmos completavam 6 meses de vida. Juntamente com esses animais, os grupos controle (GLD PBS, Balb/c PBS e Balb/c) também foram sacrificados. Antes do sacrifício foi retirado sangue dos animais através de punção do plexo retro orbitário.

4.3 Protocolo de Obtenção e Isolamento das Células Mononucleares da Medula Óssea

As células de medula óssea foram obtidas de camundongos Balb/c jovens, singeneicos. Para obtenção os animais foram submetidos à anestesia com quetamina (35 mg/kg) e xilazina (9 mg/kg) por via intraperitoneal e sacrificados por tração medular. O fêmur e tibia dos animais foram expostos, sendo retirada pele e tecido muscular; em seguida as epífises distais e proximais foram cortadas. A medula óssea foi obtida por “*flushing*” de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4 com agulha 25 X 7 (código 22g1, Becton Dickinson, USA) e dissociadas por homogeneização. A suspensão celular obtida foi submetida à separação por gradiente de *Percoll*[®] (Pharmacia, Uppsala, Suecia) na densidade de 1,077 g/cm³, por 25 minutos à temperatura ambiente. As frações de células mononucleares correspondentes ao anel formado durante a centrifugação, foram recolhidas. Seguiu-se então a lavagens com PBS para retirada do *Percoll* e quantificação das células mononucleares em câmara de *Neubauer*. Um total de 1x10⁶ células foram ressuspensas em 200 µL de PBS . Antes do uso, a suspensão celular foi levada à estufa a 37°C por 25 minutos, aspirada em seringa de insulina e mantida por um período máximo de 20 min a 37°C até sua utilização. A

suspensão celular ou PBS foi injetada através da veia caudal nos animais teste e controle, respectivamente.

4.4 Proteinúria de 24 horas

Trinta dias após a injeção de MOM ou PBS, os camundongos de todos os grupos experimental (Gld MOM) ou controle (Balb/c, Gld e Gld PBS e Balb/c PBS) foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas para possibilitar a coleta de urina.

A proteinúria foi quantificada através do método colorimétrico pelo Vermelho de Pirogalol (Proteinúria PP, Gold Analisa Diagnostica test, MG, Brasil). Todos os ensaios foram realizados segundo as instruções fornecidas pelo fabricante.

O volume urinário / 24 horas de cada animal foi medido e colocado em tubos de ensaio. Após agitação e incubação a 37°C durante 10 minutos as amostras de urina foram analisadas quanto a presença de proteína por espectrofotometria (Hitachi U 1000, Ozaka, Japan) em comprimento de onda de 600 nm. O cálculo de concentração de proteína das amostras foi obtida através da seguinte fórmula:

$$\text{Ct} = \text{At} / \text{Ap} \times 1000 \times \text{Vol. Urinário de 24h em litros} = \text{mg/24h de proteínas}$$

onde, Ct = concentração do teste; At = Absorbância do teste; Ap = Absorbância do padrão.

4.5 Obtenção e processamento das amostras de rim

Os animais foram anestesiados com solução de quetamina 35mg/kg e xilazina 9mg/kg, por via intraperitoneal e submetidos à perfusão vascular com

500ml de salina (NaCl a 0.9%) acrescida de 5.000 U de heparina. A perfusão foi realizada através de punção cardíaca em ventrículo esquerdo, por 20 minutos, através do uso de *scalp* número 23G (Med Vein). Após a perfusão os rins foram retirados e cortados longitudinalmente, sendo uma metade fixada em solução fixadora de Gendre por 4 horas e posteriormente em formaldeído a 10% tamponado, por 12 horas. Os rins foram desidratados em soluções de etanol 70%, 95% e 100%; clarificados em duas mudas de xilol e embebidos em parafina (dois banhos de parafina). A outra metade foi congelada em resina OCT-*Tissue TEK* (Miles, USA) e mantida no congelador em temperatura de -70° C até o uso.

4.6 Estudo Morfológico

Cortes histológicos com 3 μ m de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e corados pela hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS).

4.7 Estudo histomorfométrico

Para o estudo histomorfométrico foram capturadas imagens através de câmara fotográfica digital Evolution VF (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) acoplada a microscópio óptico Eclipse E800 (Nikon, Japan) e a um computador. As quantificações foram feitas nas imagens obtidas (2048 x 1536 pixels buffer) usando o sistema de análise de imagens IMAGE PROPLUS 4.5.1 (Media Cybernetics). Os seguintes parâmetros foram verificados:

4.7.1. Celularidade glomerular

As imagens histológicas foram capturadas de cortes corados pelo PAS, usando uma lente objetiva com aumento de 40x e foram avaliados campos

consecutivos contendo glomérulos, num total de 15 campos por animal. Foram contados todos os núcleos das células existentes no tufo glomerular e divididos pela área do tufo glomerular. O resultado foi expresso como a média de células/glomérulo/animal.

4.7.2 Índice de expansão mesangial (densidade de superfície mesangial)

As imagens histológicas foram capturadas de cortes corados pelo PAS, usando uma lente objetiva com aumento de 40x e foram avaliados campos consecutivos contendo glomérulos, num total de 15 campos por animal. Utilizamos um índice de área glomerular que consiste na relação área de mesângio / área do tufo glomerular.

4.7.3 Estudo semi-quantitativo do mesângio/esclerose mesangial

O mesângio / esclerose mesangial também foi quantificado através de um sistema de pontuação (escore) obtido de cortes histológicos corados pelo PAS seguindo o seguinte critério: 0=ausência de alargamento do eixo mesangial; 1=alargamento do eixo mesangial (até 5% do tufo glomerular); 2=alargamento de 5% a 25% do tufo glomerular; 3=alargamento de 25% a 50% do tufo glomerular e 4=alargamento do tufo glomerular em mais do que 50%.

4.8 Imunofluorescência Direta para detecção da deposição de IgM, IgA, IgG e C3

Cortes congelados das amostras de tecido renal com 3 μ m de espessura foram fixados com acetona gelada por 10 minutos e incubadas com anticorpos dirigidos anti-imunoglobulina G (IgG) de camundongo conjugada ao isotiocinato de

fluoresceína (FITC) (Sigma, Saint Louis, USA), anti-imunoglobulina M (IgM) – FITC (Sigma) anti-imunoglobulina A (IgA) – FITC (Sigma), C3 de camundongo (fração 3 do complemento) – FITC (Cappel, PA, USA) e visualizados em microscópio de epifluorescência Eclipse-800 (Nikon, Japan).

Os protocolo descrito a seguir foi utilizado para todos os anticorpos. Antes do início das reações, os cortes permaneceram por quinze minutos a temperatura ambiente sendo a seguir lavados com PBS em três repetições de dez minutos cada. Para bloqueio das ligações inespecíficas foi utilizado PBS-BSA a 5% por uma hora em câmara úmida. A seguir foi feita a incubação por uma hora dos anticorpos primários diluídos em PBS nas seguintes concentrações: anti-IgM FITC 1:60, anti-IgA FITC 1:60 e anti-IgG FITC 1:60 e anti-C3 FITC 1:100. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS - Tween 0,25% em duas repetições de cinco minutos cada. Logo após, foram lavados com PBS - Tween 0,25% em duas repetições de cinco minutos cada e a seguir em água destilada. Os cortes histológicos foram contracorados com Azul de Evans 0,0005% por cinco minutos e montados com *vectashield* (Vector Laboratories, CA, USA).

Como controles negativo da reação foram utilizados cortes congelados incubados com soro de camundongo não imune.

4.9 Dosagem de Imunoglobulinas (IgM e IgG) e anticorpos específicos (DNA de dupla fita e histona)

Os soros provenientes de sangue obtido por sangria através de plexo retro orbitário dos animais dos diferentes grupos experimentais, foram mantidos a - 20°C até a sua utilização. As concentrações de IgM e IgG totais foram aferidas utilizando teste imunoenzimático (ELISA), como classicamente descrito.

Resumidamente, placas de 96 poços com fundo chato (Greiner labortechnik, Alemanha) foram sensibilizadas com anticorpos de anti-*mouse* IgM ou anti-*mouse* IgG (2 µg/ml) (Southern Biotechnology, AL, USA) *overnight* e posteriormente bloqueadas com PBS + 1% gelatina (Vetec, São Paulo, Brasil) durante trinta minutos a 37°C. Os soros foram diluídos em PBS + 1% gelatina + 0,1% Tween 20 (Sigma) e incubados *overnight* a 4°C. Após lavagem com PBS contendo 0,1% Tween 20, foram adicionados anticorpos secundários anti-*mouse* IgM ou anti-*mouse* IgG conjugados com peroxidase (Southern Biotechnology, AL, USA) e incubados durante noventa minutos a 37°C. Após nova lavagem com PBS + 0,1% Tween, a revelação foi feita com tampão citrato contendo 0,5 mg/ml de OPD (Sigma) e 10 µl/ml de H₂O₂ a 3% (Sigma) e parada com solução de H₂SO₄ 2M. A densidade ótica foi obtida através de leitura em espectrofotômetro de placa, com filtro de 492 nm. As concentrações de IgM e IgG totais foram calculadas a partir de uma curva padrão de IgM e IgG murina, respectivamente (Caltag, CA, USA). Para a dosagem de anticorpos específicos, o mesmo procedimento foi usado, exceto pela sensibilização das placas feita com 5 µg/mL os antígenos dsDNA e histona purificados (Sigma). Os resultados foram expressos em valores de densidade ótica para diluição dos soros de 1:100.

4.10 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos a análise estatística com auxílio do programa *Microsoft Excel®* e *SigmaStat®*.

Os resultados da análise histomorfométrica dos grupos foram expressos sob a forma de média ± desvio padrão. Na comparação de mais que duas médias em uma única variável categórica independente (fator), aplicou-se o teste de

Análise de Variância (ANOVA) e o pós-teste Student-Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Quando os dados eram não paramétricos, foram descritos como mediana [intervalo de confiança] e a análise foi feita através do teste de Kruskal Wallis seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls.

5 RESULTADOS

5.1. Caracterização do modelo

Os animais Balb/C do sexo feminino, com 3, 5 e 7 meses de idade não apresentaram modificações da estrutura glomerular como demonstrado na FIGURA 7 (A-C).

Quanto aos animais *gld*, foi observado na coloração pelo H&E, que aos 3 meses de idade, o rim demonstrava na maioria dos glomérulos estrutura também preservada, havendo alguns com discreto alargamento do eixo mesangial e proliferação focal ou segmentar de células mesangiais (FIGURA 7 D), levando ao aumento significativo ($p < 0,05$) do número de células quando comparado com os animais Balb/c demonstrado na FIGURA 7 (A-C).

O aumento da celularidade glomerular nos animais *gld*, se torna bastante pronunciada a partir dos 5 meses de idade (FIGURA 7 E) sendo semelhantes aos animais *gld* 7 meses (FIGURA 7 F), estes mostraram um aumento significativo em relação aos animais *gld* 3 meses ($p < 0,05$).

Animais Balb/c 3, 5 e 7 meses de idade, não mostravam alterações nos componentes do corpúsculo renal, logo, os glomérulos estavam dentro dos padrões de normalidade, como demonstrado na FIGURA 8 (A-C).

Estudando a matriz mesangial dos animais *gld* de 3 meses de idade, foi observado, na coloração pelo PAS, um discreto alargamento difuso do eixo mesangial (FIGURA 8 D), o que se mostra mais exuberante ou mesmo com esclerose mesangial focal e segmentar (FIGURA 8 E) nos animais *gld* 5 meses. Raros glomérulos nesta fase se mostram globalmente escleróticos.

Com 7 meses de idade, os animais *gld*, apresentam glomérulos com mais ou com menos células, neste último caso devido ao aumento da esclerose

mesangial que em geral é focal e segmentar ou mais raramente global. Tanto animais *gld* com 5 e 7 meses, apresentam alguns glomérulos com intensa esclerose mesangial, como demonstrado na FIGURA 8 (E e F).

Embora os animais Balb/C *gld* do sexo masculino tenham apresentado lesões glomerulares semelhantes às observadas nas fêmeas, elas eram menos proeminentes, dados não mostrados.

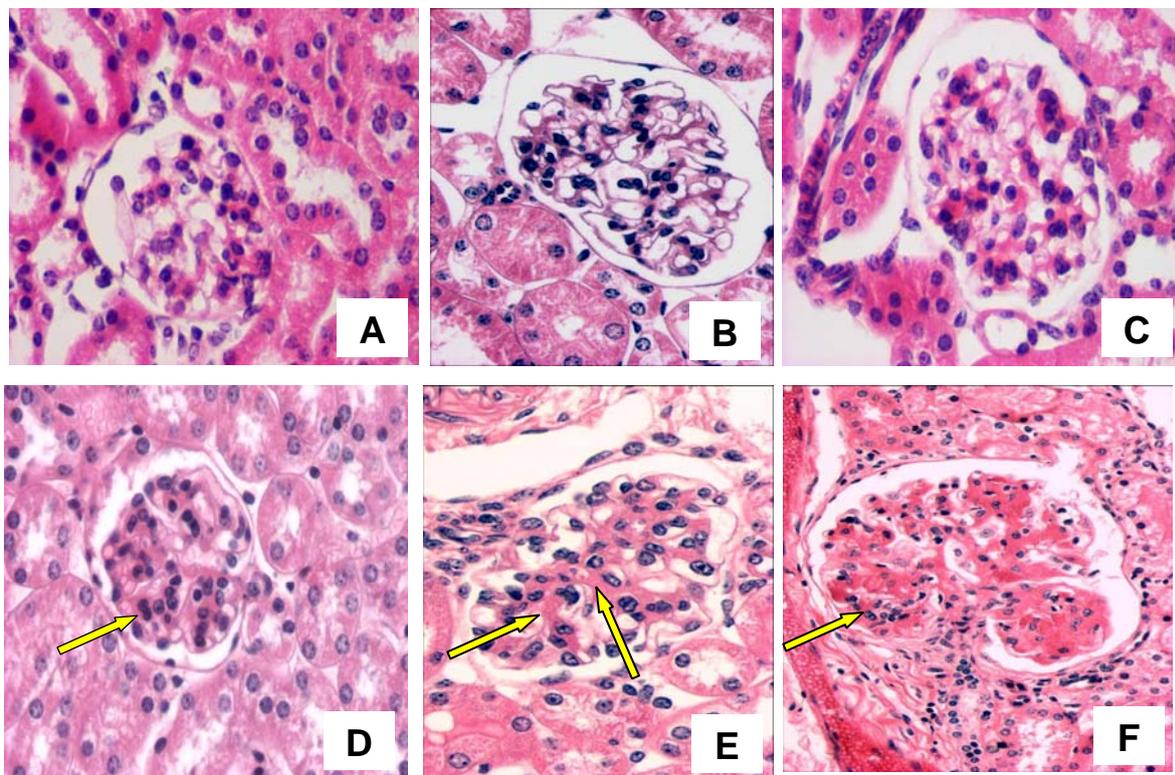


FIGURA 7 - Fotomicrografias representativas do glomérulo em animais Balb/c e Gld. **(A)** Balb/c com 3 meses, apresentando estrutura renal com glómérulo normal; **(B)** Balb/c com 5 meses apresentando glómérulo normal; **(C)** Glomérulo normal em animal Balb/c com 7 meses; **(D)** Glomérulo renal com discreta hiper celularidade mesangial (seta) em animal *gld* com 3 meses; **(E)** Glomérulo renal com alargamento do eixo mesangial (seta) em animal *gld* com 5 meses; **(F)** Glomérulo lobulado devido a hiper celularidade e alargamento mesangial (seta) em animal *gld* com 7 meses. Coloração pela H&E. Aumento original: 400x.

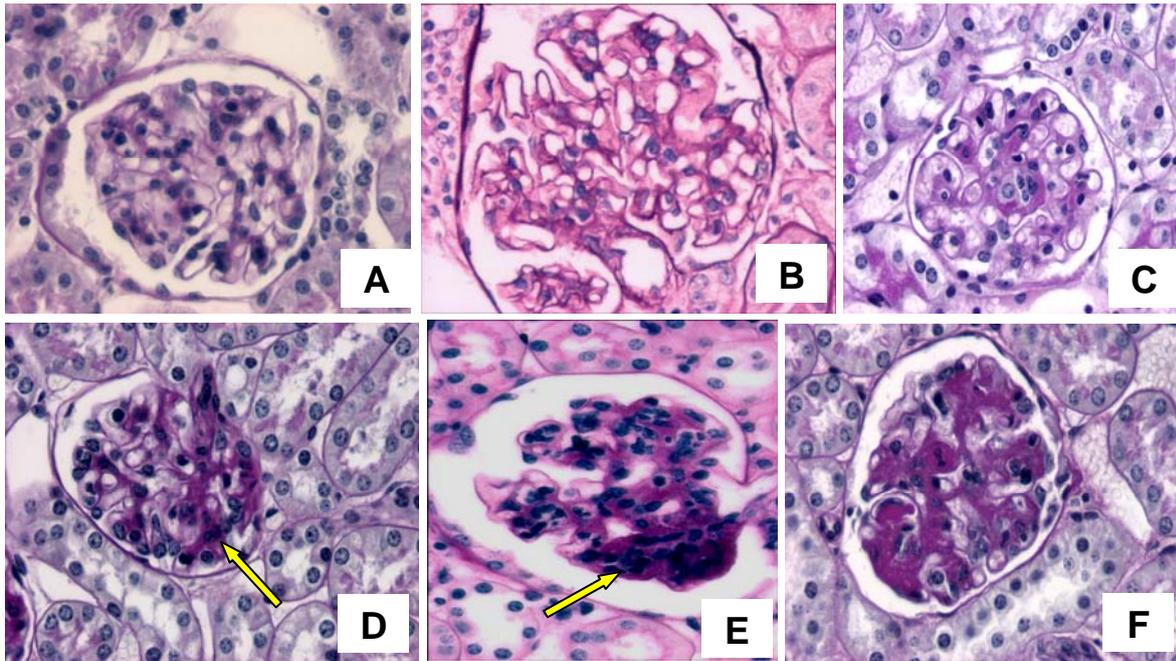


FIGURA 8 - Fotomicrografias representativas do glomérulo nos animais Balb/c e *Gld*. Glomérulos normais nos animais **(A)** Balb/c com 3 meses; **(B)** Balb/c com 5 meses; **(C)** Balb/c com 7 meses; **(D)** *Gld* com 3 meses apresentando alargamento difuso do eixo mesangial; **(E)** *Gld* 5 meses com hiper celularidade mesangial e esclerose segmentar (seta); **(F)** *Gld* 7 meses mostrando exuberância do eixo mesangial que se mostra quase totalmente esclerótico (hipocelular e com reatividade tintorial ao PAS). Coloração pelo PAS. Aumento original: 400x.

5.1.1. Análise do número de células glomerulares

Não houve diferença no número de células nos glomérulos renais nos animais Balb/c de 3, 5, 7 meses de idade. Por este motivo os resultados foram agrupados. Os animais *gld* de 3, 5, 7 meses de idade mostraram aumento significativo de 42%, 50% e 50% respectivamente, do número de células no glomérulo renal, quando comparados com os animais Balb/c ($p < 0,05$) (FIGURA 9).

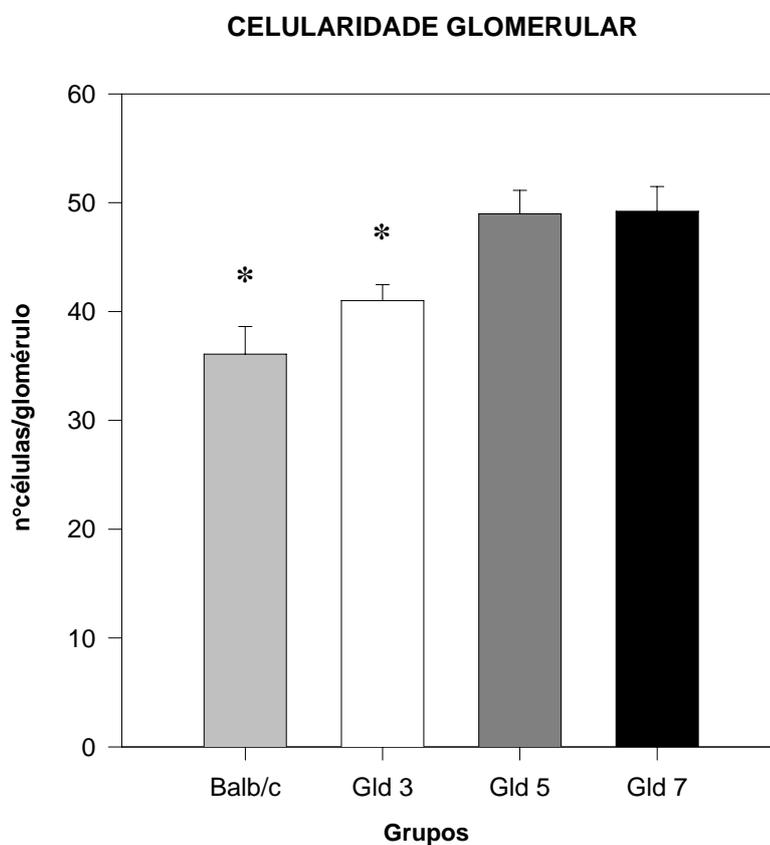


FIGURA 9 - Número de células no glomérulo renal dos animais Balb/c e *gld*. Há aumento significativo de células no glomérulo dos animais *gld* a partir de 3 meses quando comparados com animais Balb/c ($p < 0,05$).

* $p < 0,05$ vs. demais grupos.

5.1.2. Índice de Expansão Mesangial (Densidade de superfície mesangial)

Os animais *gld* de 3, 5 e 7 meses mostraram aumento significativo da densidade de superfície mesangial em comparação aos animais Balb/c ($p < 0,05$) (FIGURA 10). Os animais *gld* de 5 e 7 meses, quando comparados entre si, não mostram diferença. Já os animais Balb/C de 3, 5 e 7 meses de idade, não demonstraram diferença entre si, por isso foram agrupados.

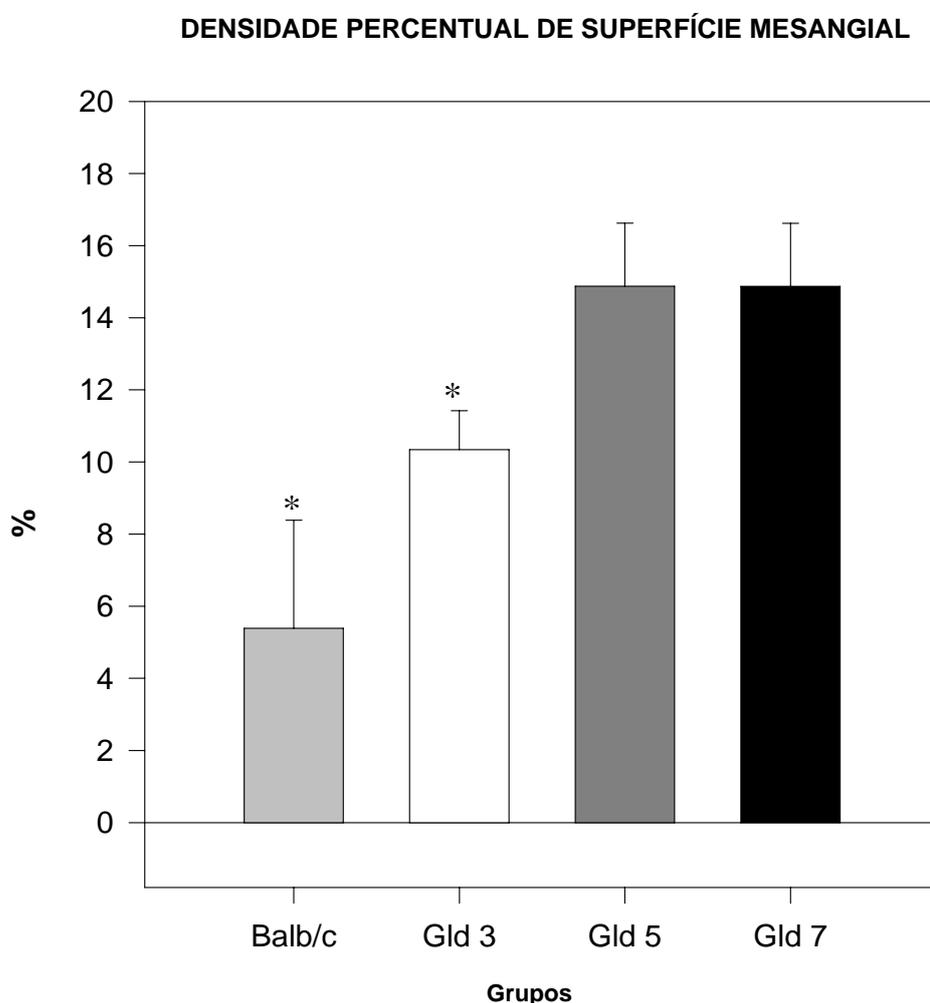


FIGURA 10 - Densidade de superfície mesangial nos animais Balb/c e *gld* 3, 5 e 7 meses. Os animais *gld* apresentam maior densidade de superfície mesangial ($p < 0,05$) em relação aos animais Balb/c. Não foi observada diferença entre os animais *gld* 5 e 7 meses.

* $p < 0,05$ vs. demais grupos.

5.1.3. Análise de Imunofluorescência direta

Em relação a imunofluorescência direta, verificamos que os animais *gld* apresentam deposição em pequena quantidade de imunoglobulinas A, M e G e C3 no mesângio glomerular. Estes depósitos aumentaram progressivamente em 5 e 7 meses de idade dos animais, estando representado abaixo o resultado referente a animais de 5 meses. A deposição dos anticorpos ocorreu na região mesangial principalmente e em alças capilares (FIGURA 11 B-E). Animais Balb/c da mesma idade não apresentam reatividade aos anticorpos (FIGURA 11 F).

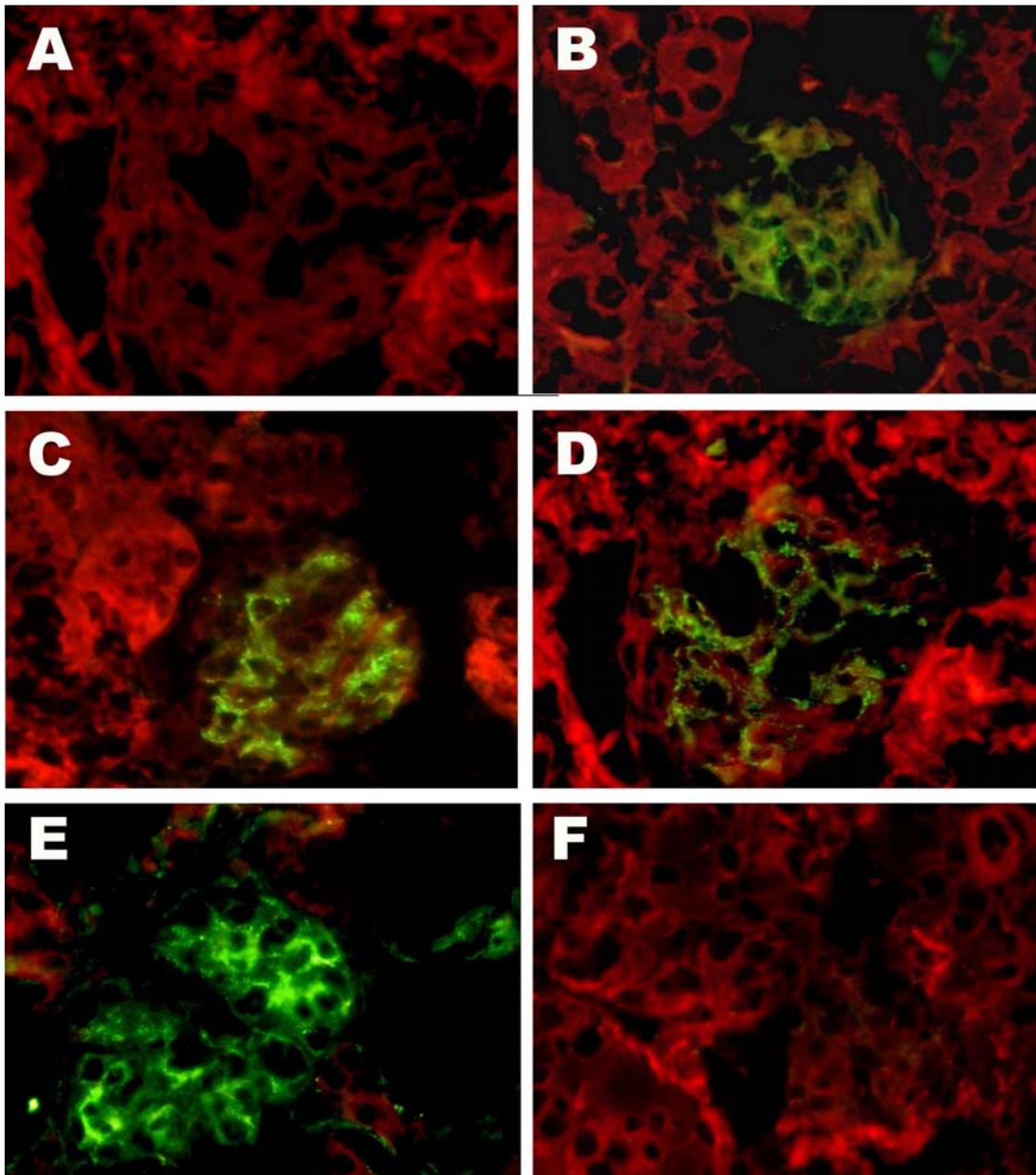


FIGURA 11 - Imunofluorescência direta para detecção de imunoglobulinas em secções de rim congelado cortados em criostato nos glomérulos renais de animais *gld* de 5 meses de idade (A-E). **(A)** Controle negativo da reação em secção de rim incubado com solução de PBS; **(B)** Anti-IgA-FITC; **(C)** Anti-IgG-FITC; **(D)** Anti-IgM-FITC; **(E)** Anti- C3-FITC; **(F)** Animal Balb/c incubado com anti-C3-FITC exibindo ausência de deposição imune. Aumento original: 400x.

5.2. Análise da proteinúria / 24hs dos grupos experimentais

A proteinúria em 24h foi a mesma tanto nos animais *gld* quanto nos animais *gld* PBS. Após a injeção de MOM os animais *gld* MOM apresentaram redução significativa da proteinúria ($p < 0,05$) quando comparados com os animais *gld*, *gld* PBS e Balb/c (FIGURA 12).

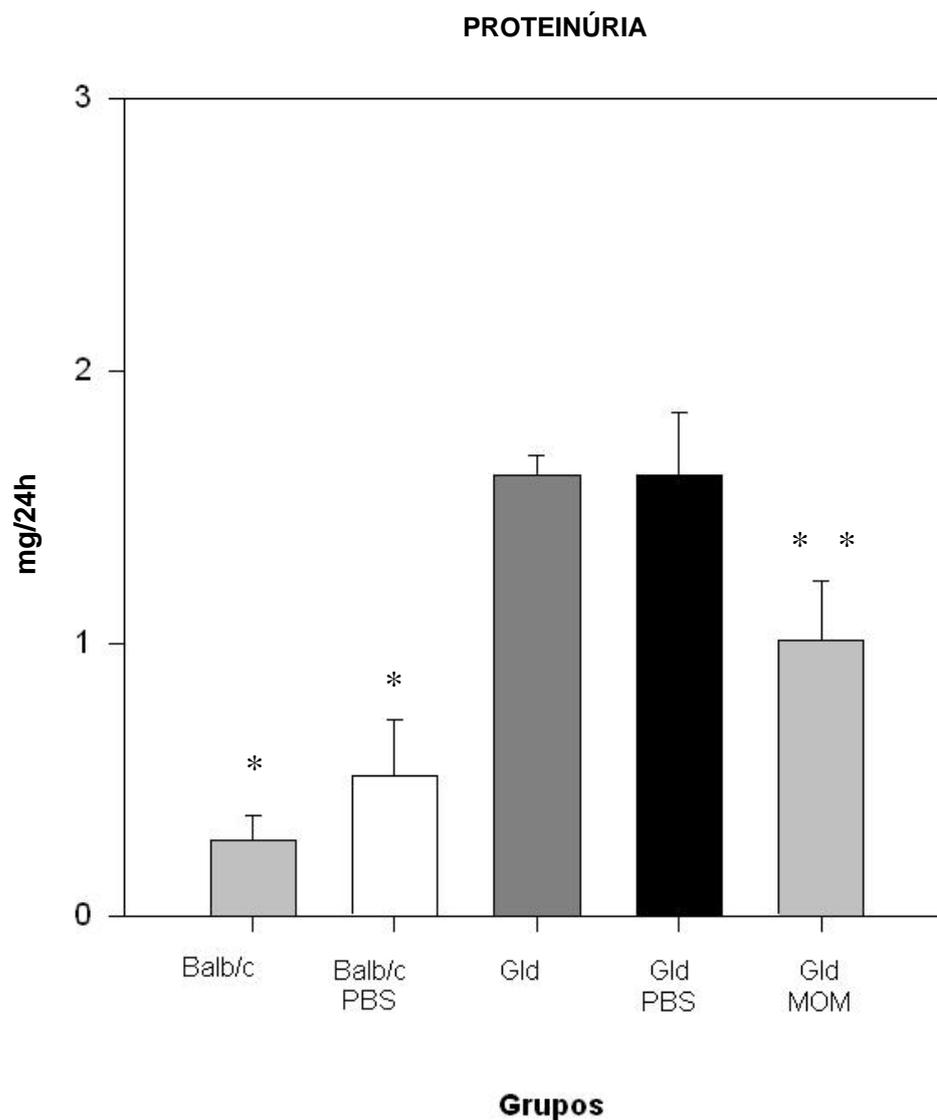


FIGURA 12 - Gráfico da concentração de proteína na urina (mg/24h) dos grupos controles e experimentais. Animais Gld MOM demonstraram diminuição ($p < 0,05$) dos níveis de proteinúria em relação aos animais Gld e Gld PBS. A proteinúria dos animais Balb/c PBS é semelhante ao dos animais Balb/c ($p > 0,05$).

* $p < 0,05$ vs. Gld, Gld PBS e Gld MOM

** $p < 0,05$ vs. demais grupos

5.3. Análise histopatológica dos grupos experimentais

Os camundongos Balb/c de 5 meses de idade, sem tratamento, foram sacrificados após um mês, logo, estavam com 6 meses de idade e não mostraram alterações da estrutura glomerular (FIGURA 13 A). Animais Balb/c com 5 meses de idade, injetados com PBS e sacrificados após um mês, também não exibem modificações da estrutura glomerular (FIGURA 13 B). Camundongos *gld* com 5 meses de idade submetidos ou não a injeção de PBS, sacrificados após um mês, exibiam hiperplasia mesangial e esclerose focal e segmentar, como demonstrado na FIGURA 13 (C e D). Camundongos *gld* com 5 meses de idade, injetados com MOM e sacrificados após um mês, demonstraram diminuição do alargamento mesangial e diminuição da proliferação celular (FIGURA 13 E).

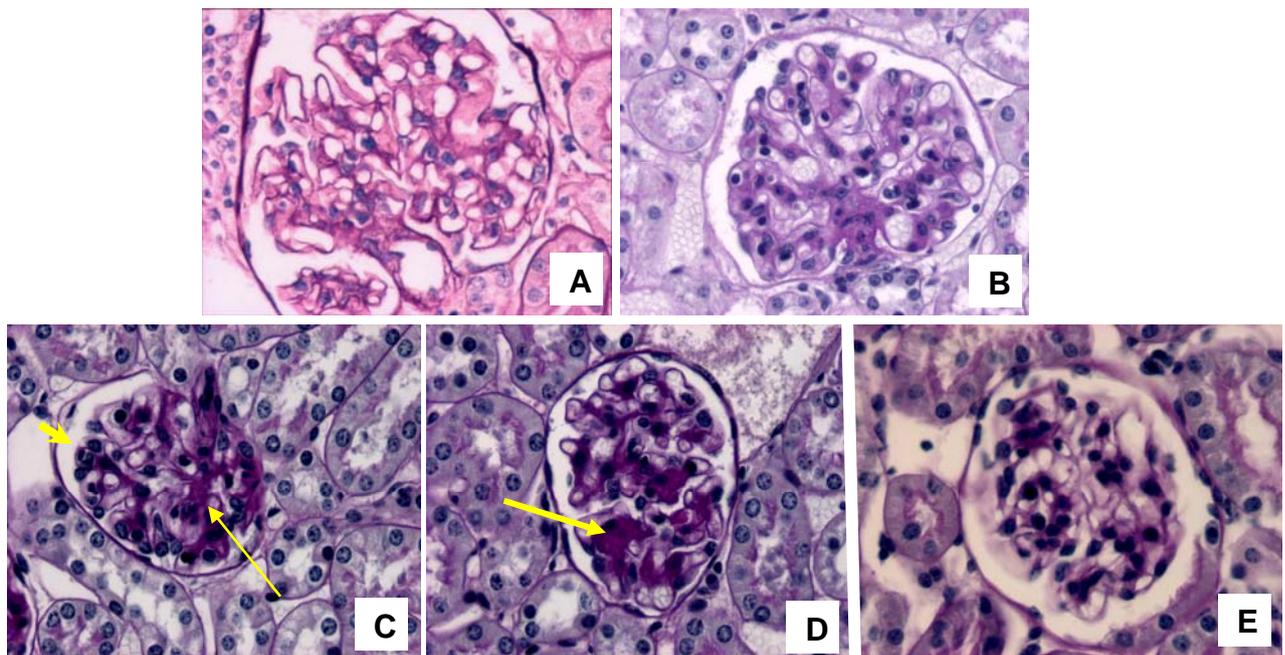


FIGURA 13 - Fotomicrografias representativas dos glomérulos renais de animais Balb/c e Gld 5 de idade, sacrificados após um mês. **(A e B)** Balb/c e Balb/c PBS respectivamente, demonstram estrutura glomerular preservada; **(C e D)** Gld e Gld PBS, respectivamente, demonstram hiperplasia mesangial (cabeça da seta) e esclerose focal e segmentar (seta); **(E)** Gld MOM diminuição do alargamento mesangial e diminuição da proliferação celular. Coloração pelo PAS. Aumento original: 400x.

5.4. Análise do número de células glomerulares dos grupos experimentais

Os animais *gld* MOM mostraram diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de células glomerulares em comparação com os grupos controles *gld* e *gld* PBS como também em relação aos animais Balb/c ($p < 0,05$) (FIGURA 14).

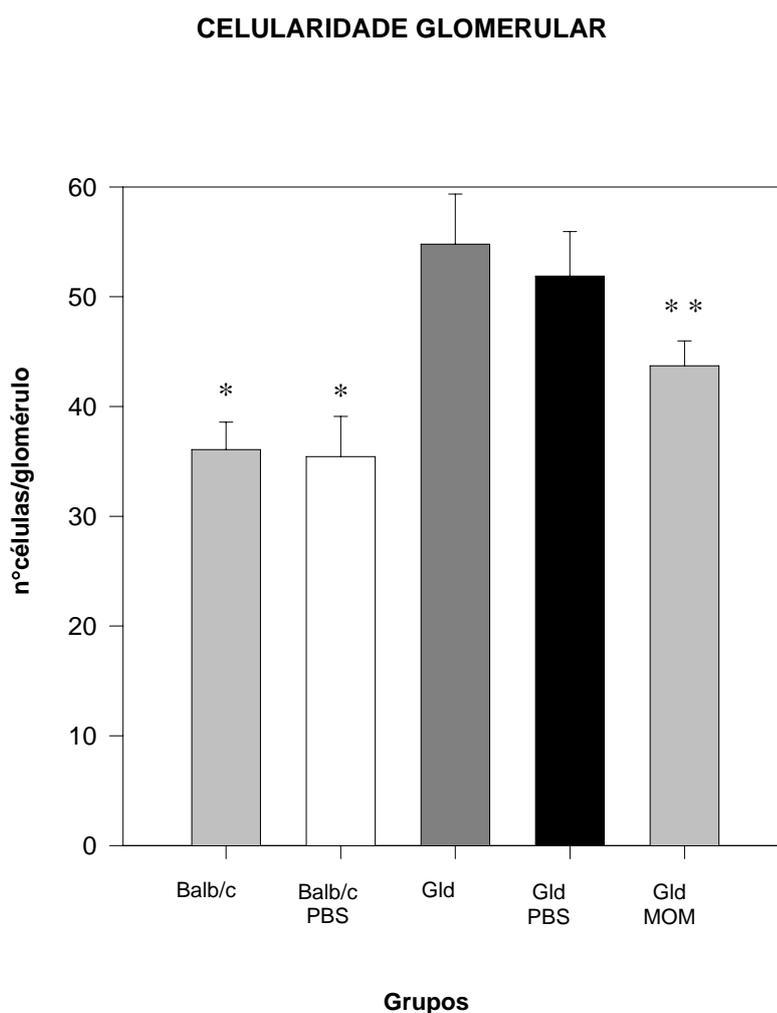


FIGURA 14 - Número total de células por tufo glomerular dos grupos controles e experimentais. Os animais *gld* MOM apresentam menor celularidade em relação aos animais dos grupos *gld* PBS e *gld*.

* $p < 0,05$ vs. Gld, Gld PBS e Gld MOM

** $p < 0,05$ vs. demais grupos

5.5. Índice de Expansão Mesangial dos grupos experimentais

Nos animais *gld* MOM o mesângio dos glomérulos justa-medulares mostraram-se significativamente diferentes ($p < 0,05$), em relação aos animais Balb/C, mas não em relação aos animais *gld* PBS (FIGURA 15).

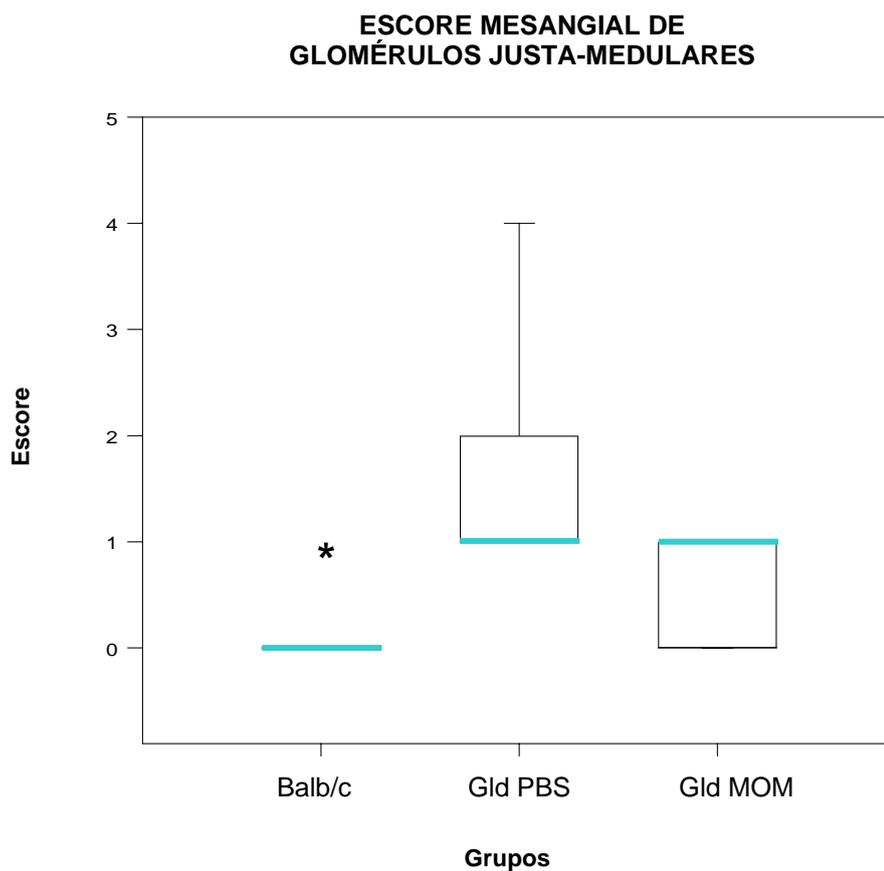


FIGURA 15 - Escore mesangial dos glomérulos justa-medulares. Observa-se redução significativa da expansão mesangial nos animais *gld* MOM vs Balb/c. * $p < 0,05$ vs. Gld e Gld MOM

Nos animais *gld* MOM o mesângio dos glomérulos corticais mostraram-se significativamente diferentes ($p < 0,05$) em relação aos animais Balb/C, mas não quando comparados com animais *gld* PBS (FIGURA 16).

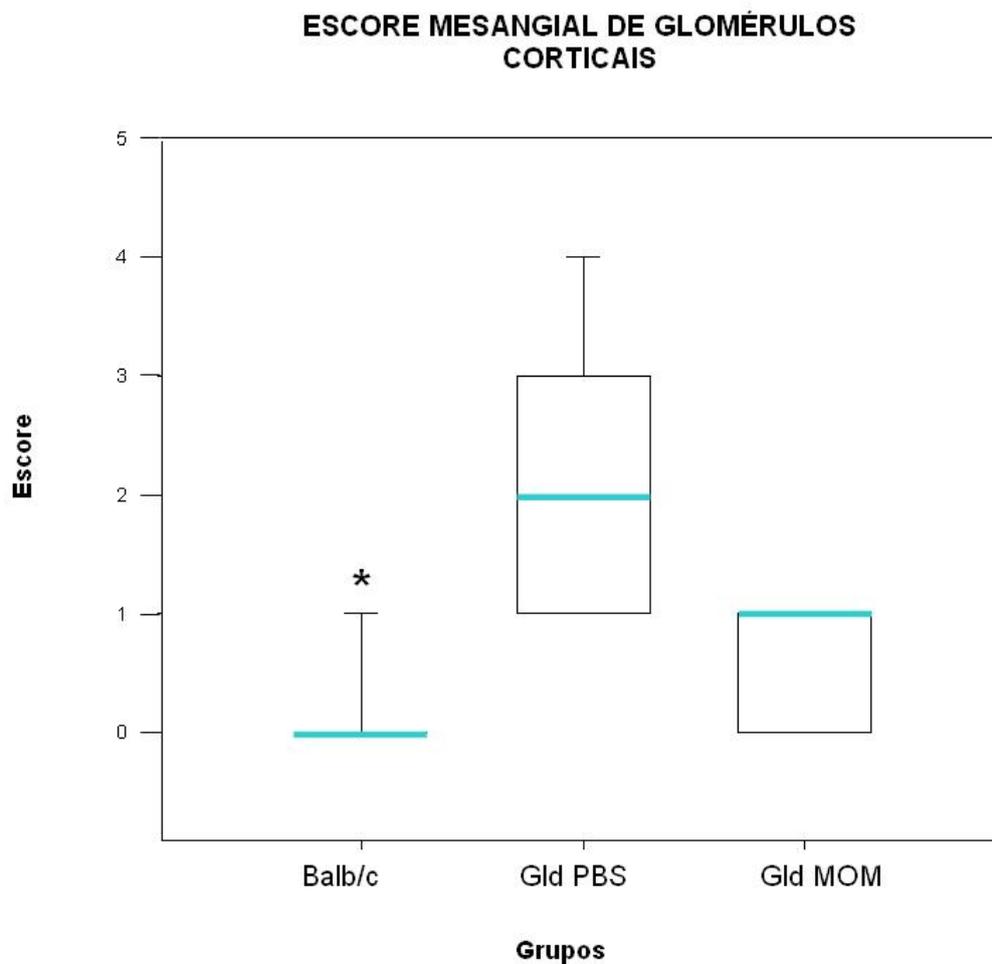


FIGURA 16 - Escore mesangial dos glomérulos corticais. Observa-se redução significativa da expansão mesangial nos animais *gld* MOM vs Balb/c.
* $p < 0,05$ vs. demais grupos

5.6. Análise da Imunofluorescência Direta dos grupos experimentais

Os animais Balb/c 5 meses de idade, sacrificados após um mês, não apresentaram depósito glomerular de imunoglobulinas ou C3, como demonstrado na FIGURA 17 (C, F, I e L). Por outro lado, todos os glomérulos dos animais Gld PBS 5 meses, sacrificados após um mês a injeção de PBS, se mostraram reativos para todos os anticorpos testados na região mesangial, como demonstra a FIGURA 17 (A, D, G e J). Os camundongos Gld MOM 5 meses de idade, sacrificados após um mês a injeção de MOM, verificou-se diminuição da deposição de IgM, C3, IgA e IgG na região mesangial, em relação ao grupo Gld, como demonstra a FIGURA 17 (B, E, H e K).

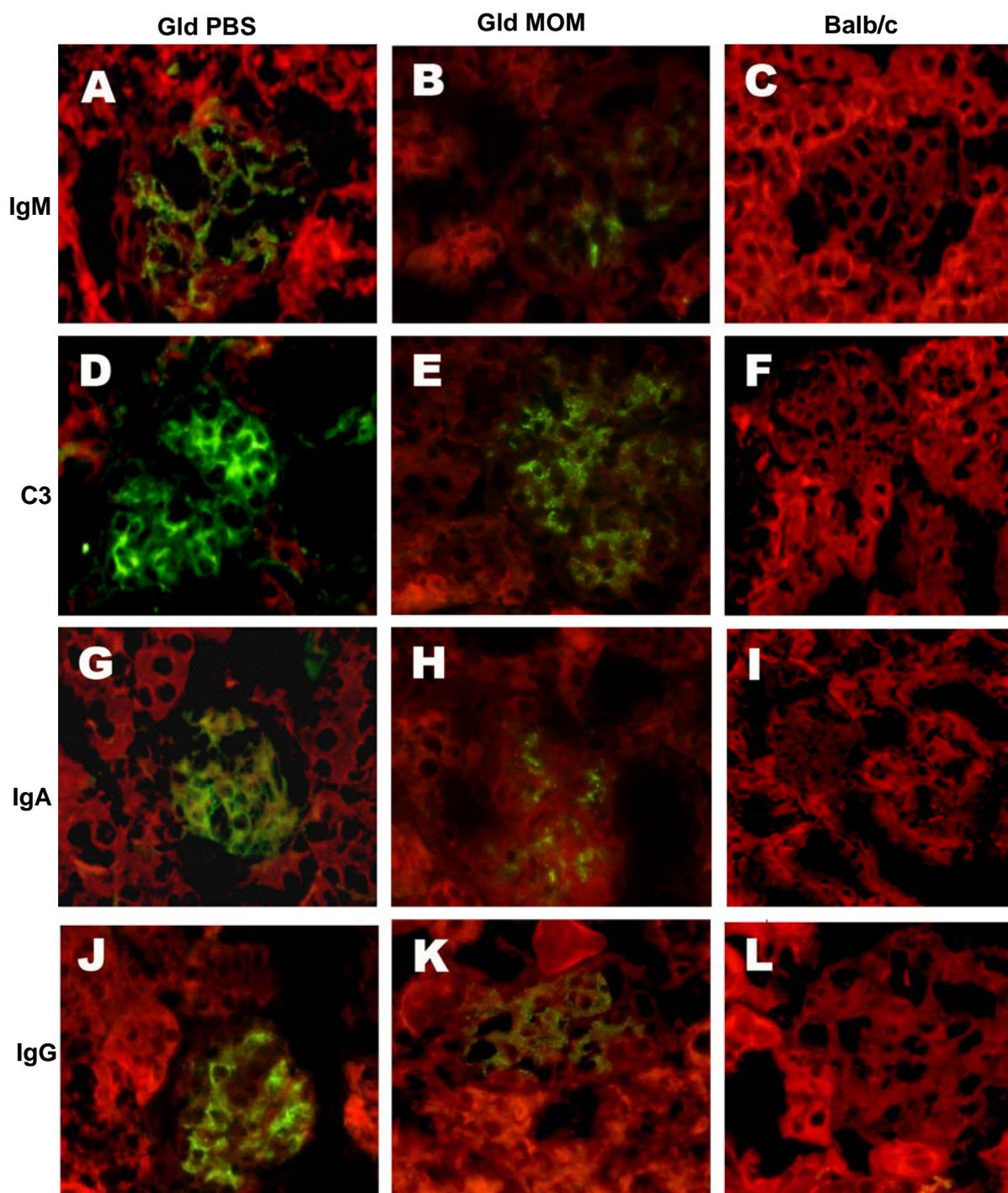


FIGURA 17 - Imunofluorescência direta no rim de animais de 5 meses, sacrificados após um mês. Balb/c, Gld PBS e Gld MOM. **(A)** Animais Gld com depósito de IgM no mesângio e em algumas alças capilares; **(B)** Animais Gld MOM evidenciando menor deposição de IgM do que os animais Gld PBS; **(C)** Ausência de depósito de IgM em animais Balb/c; **(D)** Intensa deposição de C3 em animais Gld PBS; **(E)** Menor deposição de C3 no mesângio de animais Gld MOM em relação aos animais Gld PBS; **(F)** Ausência de depósitos de C3 no glomérulo de animais Balb/c; **(G)** Depósito de IgA no mesângio de animais Gld PBS; **(H)** Menor deposição de IgA nos animais Gld MOM em relação aos animais Gld PBS; **(I)** Ausência de deposição de IgA nos animais Balb/c; **(J)** Depósito de IgG no mesângio de animais Gld PBS; **(K)** Menor depósito de IgG no mesângio dos animais Gld MOM em comparação com os animais Gld PBS; **(L)** Ausência de depósito de IgG nos animais Balb/c. Aumento original: 400x.

5.7. Análise dos complexos imunes circulantes (IgM e IgG) dos grupos experimentais

Animais *gld* PBS e *gld* MOM apresentaram aumento de complexos imunes circulantes (IgM e IgG) quando comparados com os animais Balb/c. O tratamento com MOM não modificou os níveis circulantes de complexos imunes, como demonstra a FIGURA 18.

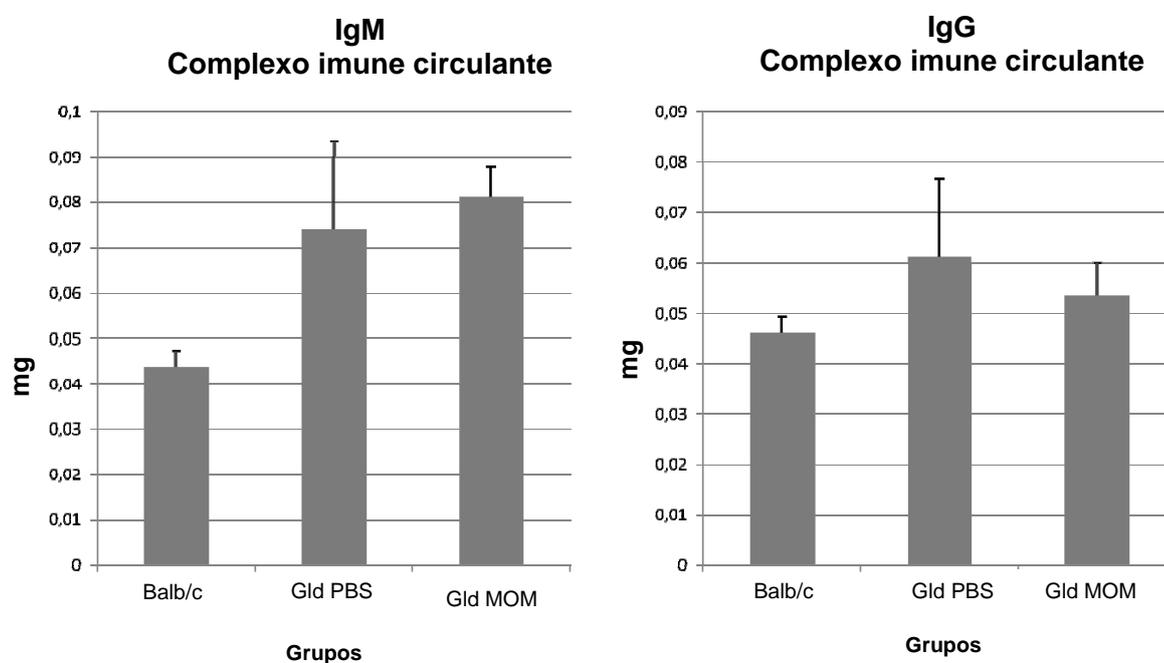


FIGURA 18 - Níveis circulantes dos complexos imunes (IgM e IgG) nos animais *gld* PBS e *gld* MOM. Os animais *gld* PBS e *gld* MOM apresentaram aumento de complexos imunes circulantes quando comparados com os animais Balb/c. O *gld* MOM e *gld* PBS quando comparados não foi significativo ($p > 0,05$). Valores expressos sob a forma de média de 3 animais / grupo \pm DP.

5.8. Análise de anticorpos anti-DNA de dupla fita (IgM e IgG) dos grupos experimentais

Os animais *gld* PBS e *gld* MOM apresentaram aumento de anticorpos anti-DNA de dupla fita (IgM e IgG) quando comparados com os animais Balb/c. O tratamento com MOM não modificou a quantidade de anticorpos anti-DNA de dupla fita, como demonstra a FIGURA 19.

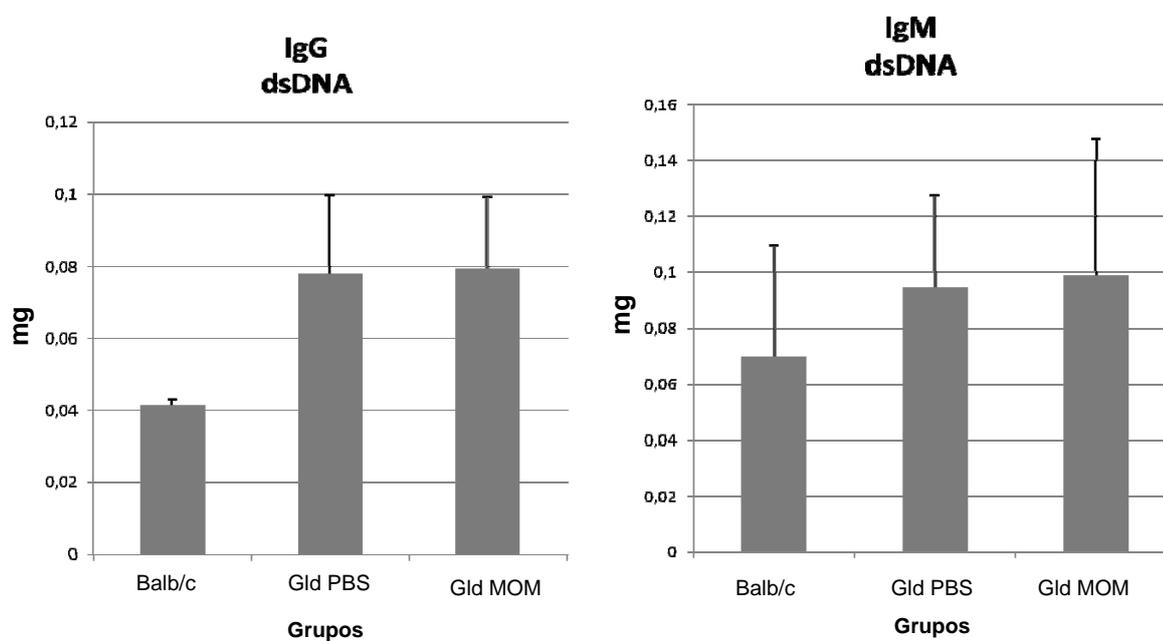


FIGURA 19 - Níveis circulantes dos anticorpos anti-DNA de dupla fita. Os animais *gld* PBS e *gld* MOM apresentaram aumento de anticorpos anti-DNA de dupla fita quando comparados com os animais Balb/c. O *gld* MOM e *gld* PBS quando comparados não foi significativo ($p > 0,05$). Valores expressos sob a forma de média de 3 animais / grupo \pm DP.

5.9. Análise de anticorpos anti-histona (IgM e IgG) dos grupos experimentais

Animais *gld* PBS e *gld* MOM apresentaram maior quantidade de anticorpos anti-histona (IgM e IgG) quando comparados com os animais Balb/c. O tratamento com MOM não modificou a quantidade de anticorpos anti-histona, como demonstra a FIGURA 20.

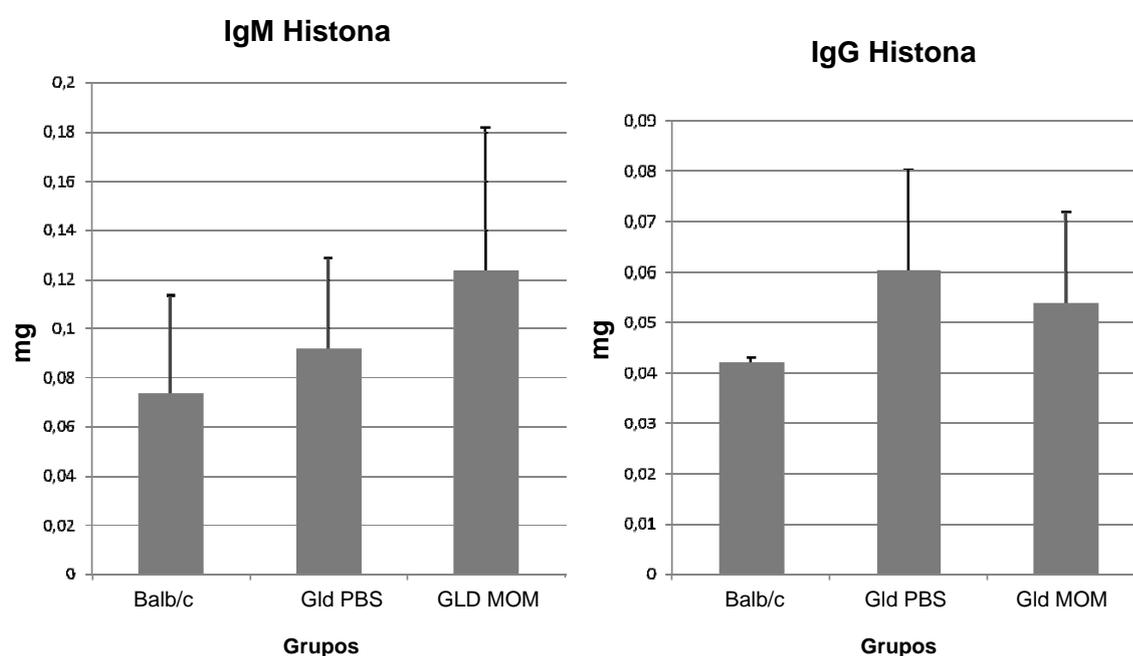


FIGURA 20 - Níveis circulantes dos anticorpos anti-histona. Os animais *gld* PBS e *gld* MOM apresentaram aumento de anticorpos anti-histona quando comparados com os animais Balb/c. O *gld* MOM e *gld* PBS quando comparados não foi significativo ($p > 0,05$). Valores expressos sob a forma de média de 3 animais / grupo \pm DP.

6. DISCUSSÃO

Os animais *lpr* e *gld* são caracterizados pela presença de mutação espontânea nos genes de Fas e FasL, respectivamente, e apresentam uma alteração na via de apoptose induzida pelo sistema Fas/FasL (ROTHS, MURPHY e EICHER, 1984). Como conseqüência da ausência de morte celular por apoptose das células imunes, estes animais desenvolvem uma doença linfoproliferativa e auto-imune de intensidade variável que depende do *background* genético dos camundongos (ROTHS, MURPHY e EICHER, 1984). Os animais *lpr* e *gld*, independente da cepa, apresentam autoanticorpos dirigidos contra DNA e outros antígenos nucleares semelhante ao que ocorre no LES.

Os camundongos MRL *lpr* desenvolvem uma forma glomerulonefrite já bem caracterizada (KELLEY e ROTHS, 1985), semelhante àquela apresentada por animais que desenvolvem a doença lupus-símile de forma espontânea ou induzida (LAMBERT e DIXON, 1968; IZUI e cols., 1977; ANDREWS e cols., 1978; ROUBINUAN e cols., 1978; CAVALLO e GRANHOLM, 1990). Ao contrário dos animais *lpr*, os camundongos MRL *gld* exibem uma forma mais branda da doença (KELLEY e ROTHS, 1985) enquanto animais C3H-*gld* desenvolvem um grau variável de alterações glomerulares como hiper celularidade, necrose, hialinização, adesão capsular, espessamento da alça capilar e inflamação intracapilar. Cerca de 14% dos animais apresentam lesão renal em grau moderado a intenso semelhante a doença humana. Em 54% dos animais as lesões são pouco expressivas ou inexistentes. Entretanto, todos os animais com idade igual ou superior a vinte e duas semanas apresentam depósitos de complexos imunes no mesângio glomerular, deposição esta que se inicia com oito

semanas de idade (ROTHS, MURPHY, EICHER, 1984). Animais C3H/*gld* apresentam entre o terceiro e o quinto mês de vida, deposição mesangial de imunoglobulinas mas não desenvolvem nefrite clínica (COHEN e EISENBERG, 1991). O fenótipo de linfoproliferação e doença autoimune associado a glomerulonefrite por complexo imune, também é visto em animais nocauteados para o gene de FasL (KARRAY e cols., 2004). Animais nocauteados para FasL (FasL^{-/-}) exibem uma forma de lesão renal mais pronunciada e de evolução mais rápida do que os animais *gld* (KARRAY e cols., 2004). Algumas cepas de animais geneticamente *lupus-prone* desenvolvem, à semelhança da nefrite humana, inflamação renal generalizada com progressão para fibrose túbulo-intersticial e glomeruloesclerose (ANDREWS e cols., 1978). Animais como o camundongo da cepa NZM.2410 só desenvolvem glomeruloesclerose com inflamação glomerular mínima (SINGH e cols., 2003). Animais MRL *lpr* desenvolvem inflamação glomerular e intersticial mas com progressão limitada para fibrose e glomeruloesclerose (ANDREWS e cols., 1978).

Em relação aos animais Balb/C *gld* utilizados neste trabalho não se tem conhecimento de descrições das lesões renais. Os animais foram produzidos no *National Cancer Institute, NCI* (Bethesda, MD, USA) (TAKAHASHI e cols., 1994) e as descrições deste animal somente se referem ao sistema imune e resposta inflamatória (BORGES e cols., 2001 e 2002; ZHANG e cols., 2004). O rim dos animais Balb/c *gld* apresentaram, de forma homogênea, a partir de três meses de idade, modificações no compartimento glomerular como os já descritos para os animais C3H/*gld* (ROTHS e cols., 1984). Os animais Balb/c *gld* apresentam uma forma de lesão renal semelhante à nefrite lúpica classe II de humanos, caracterizada por discreta hiperplasia ou alargamento mesangial com

depósitos imunes localizados em mesângio (WEENING e cols., 2004). No conjunto, as alterações vistas nos animais deste estudo são semelhantes às aquelas descritas para os animais *gld* tanto da cepa C3H quanto MRL (ROTHS, MURPHY e EICHER, 1984) parecendo não diferir daquelas dos animais *lpr* (KELLEY e ROTHS, 1985). Estes achados corroboram a hipótese de que estas mutações, apesar de não serem alélicas, afetariam uma importante via metabólica comum para a diferenciação de linfócitos T (DAVIDSON e cols., 1985).

Os animais Balb/c *gld*, de ambos os sexos, a partir dos 5 meses de idade, desenvolveram glomerulonefrite proliferativa focal mediada por complexos imunes semelhante ao descrito para os animais MRL *lpr* e *gld* e animais *gld* background C57/Bl6 e C3H/Hej (ROTHS e cols., 1984). A lesão renal, caracterizada por extensas áreas de hialinização mesangial era mais proeminente nas fêmeas. Por este motivo estes animais foram escolhidos para o presente experimento.

É bem conhecido o fato de que o LES é uma doença que afeta predominantemente as mulheres (90%) especialmente entre 15 e 64 anos (RUS e HOCHBERG, 2002). Este dado, aliado ao fato de que os hormônios sexuais femininos alteram a gravidade do lúpus murino (ROUBINIAN e cols., 1977; ROUBINIAN e cols., 1978; WALKER e cols., 1994) sugerem que estes hormônios, mas especificamente o estrogênio, participa da patogênese da doença. Alguns trabalhos mostram a associação da estimulação crônica de estrogênio e a diminuição da produção de testosterona com o LES (PERNIS AB., 2007; RANGEL A. e cols, 2002). LANG e colaboradores (2003) verificaram que o sexo pode influenciar a expansão de células T patogênicas, autoreativas levando a maior gravidade da doença auto-imune.

Os auto-anticorpos dirigidos contra dsDNA são considerados como indicadores da presença de LES, tanto em humanos quanto em murinos. Eles são detectados no soro de 30 – 60% dos pacientes com LES, sendo que de 60 – 83% de pacientes lúpicos apresentarão anti-dsDNA em algum momento durante o curso da doença (RIEMEKASTEN e HAHN, 2005). A presença de auto-anticorpos antes do início da doença e sua correlação com a atividade da doença sugerem seu papel patogênico.

A presença de anticorpos anti-dsDNA da classe IgG é altamente específica para LES e importante para o diagnóstico e o monitoramento clínico da doença (HOCHBERG, 1997). Eles são considerados patogênicos uma vez que, a sua transferência ou a transferência de hibridomas produtores de anti-dsDNA para camundongos induz glomerulonefrite do tipo lúpica (EHRENSTEIN e cols., 1995) com deposição nos glomérulos (EHRENSTEIN e cols., 1995; IMAI e cols., 1997). Por outro lado, os anticorpos anti-dsDNA da classe IgM, tem baixa afinidade, são encontrados em indivíduos normais e raramente causam doenças auto-imunes quando transferidos para animais (PISETSKY e cols., 1990; TAKI e cols., 1992). Além disso quando injetados em animais lúpicos leva ao aumento da sobrevida e redução de deposição de complexos imunes (WERWITZKE e cols., 2005) assim como na ausência de produção de IgM levam a diminuição da sobrevida e aceleração da doença em animais MRL *lpr* (BOES e cols., 2000).

As pesquisas sobre a utilização terapêutica das células-tronco é um dos tópicos mais excitantes da medicina regenerativa. Devido as limitações jurídicas, éticas e religiosas para a utilização das células-tronco embrionárias, sua aplicação tem se restringido a modelos animais. Por outro lado, células-tronco

obtidas na medula óssea adulta, tem sido investigadas em inúmeros ensaios clínicos que visam a regeneração de órgãos e tecidos.

Em relação ao tecido renal, no modelo de lesão por isquemia/reperfusão, onde a recuperação funcional do órgão é dependente do compartimento tubular, verificou-se que somente 11% das células epiteliais em proliferação nos túbulos em regeneração eram provenientes da medula óssea enquanto que 89% das células em regeneração eram originárias de células intrínsecas renais (LIN, MORAN e cols., 2005). Em outros experimentos, células originárias de medula óssea doadora não foram encontradas (DUFFIELD e cols., 2005) ou estavam presentes em pequena quantidade (LIN e cols., 2003; LANGE e cols., 2004; MORIGI e cols., 2004; SZCZYPKA e cols., 2005). Esta discrepância no achado de células provenientes da medula óssea no local da lesão provavelmente é multifatorial. PALAPATTU e colaboradores (2006) demonstraram que o grau de contribuição de células da medula óssea para a regeneração do epitélio prostático é dependente do grau de degeneração/inflamação que o órgão está submetido, sendo que a inflamação e trauma cirúrgico por si só resultam no recrutamento de células-tronco hematopoéticas da medula óssea para a circulação (FU e LIESVELD, 2000). Foi verificado que, na lesão de isquemia/reperfusão renal o grau de células mononucleares da medula óssea que se transdiferenciam em células tubulares aumenta progressivamente com o tempo de isquemia. Um a três dias após a agressão, há incorporação de poucas células, que aumenta progressivamente até o sétimo dia, alcançando um ponto máximo em torno do 14º dia (BROEKEMA et al, 2005). Embora nestes dois trabalhos não tenham sido descritos os mecanismos responsáveis pela presença de um maior ou menor

número de células, provavelmente existe uma relação com a liberação de mediadores moleculares em resposta à agressão.

Para doenças como o diabetes que cursam predominantemente com lesão glomerular (LEE e cols., 2006), na glomerulonefrite mesangioproliferativa induzida pelo anticorpo Thy1.1 (KUNTER e cols., 2006) ou no modelo de Alport (NINICHUK e cols., 2006), a injeção de células derivadas da medula óssea de camundongos foi capaz de levar a recuperação renal tanto funcional como morfológica, havendo entretanto resultados contraditórios quanto à capacidade de transdiferenciação das células derivadas da medula óssea nas populações celulares glomerulares. No modelo de diabetes, o transplante de células-tronco mesenquimais humanas levou a diminuição do alargamento mesangial e do número de macrófagos e ao repovoamento endotelial, em pequena monta (LEE e cols., 2006). KUNTER e colaboradores (2006) demonstraram no modelo de lesão anti-Thy1.1 que células-tronco-mesenquimais são capazes de reduzir em 28% a proteinúria dos animais lesados assim como reduzir o grau de mesangiólise e levar a proliferação celular glomerular (células mesangial). Porém, apesar de seis dias após a injeção, cerca de 85-95% de células da medula óssea estarem presentes nos glomérulos, não foi verificada a transdiferenciação das células-tronco mesenquimais em células glomerulares. Por outro lado, a infusão de células totais da medula óssea, depletadas (IMASAWA e cols., 2001) ou não de células T (ROOKMAAKER e cols., 2003; IKARASHI e cols., 2005), também foi capaz de melhorar a função renal dos animais lesados e repovoar os glomérulos em parte pela transdiferenciação das células da medula óssea em células mesangiais e endoteliais.

A síndrome de Alport é uma doença hereditária causada pela mutação do colágeno tipo IV, cadeias $\alpha 3$, 4 e 5 (COSGROVE e cols., 1996; KALLURI e cols., 1997; HUDSON e cols., 2003) associada a hematúria, proteinúria e perda progressiva da filtração glomerular. Neste modelo, a infusão de células totais da medula óssea foi capaz de recuperar a histologia normal glomerular em parte por transdiferenciação das células injetadas em células glomerulares (podócito e mesangial mas não endotélio capilar) (SUGIMOTO e cols., 2006). Por outro lado, o transplante de células-tronco mesenquimais não foi capaz de repovoar o glomérulo, apesar de melhorar o seu aspecto estrutural (NINICHUK e cols., 2006).

No conjunto, considerando os resultados obtidos por diversos laboratórios, tanto com a utilização de células totais da medula óssea ou fração de mononucleares quanto de células mesenquimais, o mais provável é que o retorno à normalidade histológica glomerular ou tubular se deva a fatores parácrinos e juxtácrinos. Uma série de fatores parácrinos envolvidos no recrutamento, mobilização e reparação tecidual após o transplante de células da medula óssea tem sido descritos, dentre eles, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), proteínas da família do fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de inibição de leucemia (LIF), interações entre o SDF1/CXCR4 e as citocinas IL-6 e 8 (LAPIDOT e PETIT, 2002; CERADINI e cols., 2004; TÖGEL e cols., 2005; DAR e cols., 2006; KUCIA e cols., 2006; KUNTER e cols., 2006; NINICHUK e cols., 2006; TÖGEL e cols., 2007).

A possibilidade de que as células da medula óssea transplantadas possam, por meio de efeito parácrino ou juxtácrinos, sinalizar para a mobilização e/ou diferenciação de células-tronco e progenitores multipotentes do próprio rim, já que este órgão parece ser rico em microambientes capazes que manter as células em

estado quiescentes, também não pode ser afastada. Já foram identificadas células-tronco renais (OLIVER e cols., 2004; MEIRELES e cols., 2006) e progenitores tanto em murinos (ratos e camundongos) quanto em humanos (MAESHIMA e cols., 2003; HISHIKAWA e cols., 2005; DEKEL e cols., 2006; SAGRINATI e cols., 2006).

No nosso modelo de glomerulonefrite proliferativa focal com esclerose mesangial foi possível verificar que o transplante de células mononucleares da medula óssea foi capaz de melhorar a função e reduzir tanto a esclerose quanto a proliferação celular glomerular. Não foi possível averiguar se a resolução da esclerose mesangial nos animais Balb/C *gld* foi devida a presença de repovoamento do glomérulo lesado como verificado em dois outros experimentos com esclerose mesangial (GUO e cols., 2006; LI e cols., 2006). No primeiro foi demonstrado haver repovoamento por podócitos, em pequena quantidade enquanto que no segundo, por células endoteliais e mesangiais.

A infusão de células da medula óssea, ou mesmo a realização de parabiose entre animais é uma forma de manipulação do sistema imune (GUO e cols., 2006; LI e cols., 2006). É possível que a melhora da proteinúria, do aspecto histológico e imunopatológico renal observado nos animais deste estudo seja devida à melhora do defeito imunológico. Quanto a quantificação dos autoanticorpos, o desvio padrão elevado e a não significância estatística dos resultados possivelmente são devidos a baixa amostragem.

JYONOUCHI e cols. (1981) mostraram que em animais NZB as alterações hematopóéticas vistas no início do seu desenvolvimento são corrigidas pelo transplante de medula óssea de animais compatíveis para o complexo de histocompatibilidade (MHC). Animais MRL/ *lpr* irradiados, que receberam

transplante de medula óssea, alogeneico ou singeneico, também tiveram melhora da alteração imunológica com diminuição da linfoproliferação e/ou da deposição de auto-anticorpos e da lesão renal (IKEHARA e cols., 1989; ISHIDA e cols., 1994; KARUSSIS e cols., 1995; WANG e cols., 1999; KUSHIDA e cols., 2000; IWAI e cols., 2005). Após a infusão em animais letalmente irradiados de uma mistura de células da medula óssea depletadas de linfócitos T maduros de animais congênicos e normais com o mesmo *background* genético, verificou-se que os animais receptores tinham acúmulo de células T de origem *lpr* em quantidade anormal (KATAGIRI e cols., 1988) e que somente as células B de origem *lpr* produziram auto-anticorpos (SOBEL e cols., 1991), na presença de células T de animais *lpr* (SOBEL e cols., 1993). Em experimento análogo com animais *gld*, SOBEL e colaboradores (1993; 1995) demonstraram que após cinco meses da reconstituição da medula óssea os animais exibiram pequena produção de auto-anticorpos e adenopatia residual mínima, indicando que no animal *gld* as células derivadas de medula óssea normal são capazes de recuperar o tecido (SOBEL e cols., 1993). Além disso, a co-infusão de medula óssea normal reduziu mas não preveniu o desenvolvimento das células T duplo negativas derivadas do doador e levou a supressão da produção de autoanticorpos (SOBEL e cols., 1995). Posteriormente foi verificado o papel dos linfócitos T normais na supressão ou reversão da auto-imunidade dos animais *gld* por meio da realização de parabiose com animais normais. Neste modelo também se verificou a supressão da linfadenopatia, diminuição do número de células T duplo negativas e redução da produção de autoanticorpos (KAKKANAIH e cols., 1996).

Os resultados deste estudo demonstraram que a injeção de células mononucleares da medula óssea são semelhantes aos relatos da literatura exceto

pelo fato de que em nosso experimento não foi feita ablação da medula óssea (SOBEL e cols., 1993 e 1995). NILSSON e colaboradores (1997) demonstram que mesmo em animais sem ablação de medula óssea há o repovoamento da medula óssea do receptor principalmente com o transplante de células purificadas. Este dado suporta os dados obtidos com animais parabióticos fortalecendo a hipótese de que as células T duplo negativas são deletadas na periferia e tem meia-vida curta devendo ser substituídas continuamente por uma população de células em proliferação que serão supridas pelas células transferidas (KAKKANAI AH e cols., 1996).

Em conclusão, os resultados do nosso experimento falam a favor de que o transplante de medula óssea leva a prevenção das alterações desenvolvidas no rim pela agressão imunológica, tendo em vista de que à semelhança com os achados de SOBEL e colaboradores (1993; 1995) e KAKKANAI AH e colaboradores (1996) os animais com cinco meses após o transplante de medula óssea apresentaram diminuição do baço, redução ou desaparecimento da massa ganglionar (dados não mostrados).

7. CONCLUSÃO

Os camundongos Balb/c *gld* apresentam, a partir do terceiro mês da idade, hiper celularidade glomerular progressiva associada a alargamento mesangial, esclerose glomerular segmentar, focal ou global. Estas lesões estão associadas à deposição de imunoglobulinas e C3 principalmente em mesângio glomerular assim como em alças capilares, configurando desta forma uma glomerulonefrite proliferativa progressiva.

- Os rins dos animais Balb/c *gld* de ambos os sexos se mostram lesados porém as fêmeas desenvolvem lesões mais importantes do que os machos.
- O transplante de células mononucleares da medula óssea em animais Balb/c *gld* de 6 meses de idade reduziu, significativamente, a proteinúria nas 24 horas em comparação com os animais sem tratamento.
- A terapia celular com células mononucleares da medula óssea em animais Balb/c *gld* de 6 meses de idade, diminuiu, significativamente, o número de células glomerulares e a expansão mesangial renal.
- A terapia celular com células mononucleares da medula óssea em animais Balb/c *gld* de 6 meses de idade levou a atenuação do depósito glomerular de imunoglobulinas G, A e M e da fração 3 do complemento.

- A terapia celular com células mononucleares da medula óssea em animais Balb/c *g/d* de 6 meses de idade não modificou a quantidade de complexos imunes circulantes, anticorpos anti-DNA de dupla fita e anti-histona.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS AK e LICHTMANN AH. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 5a edição; Elsevier, Rio de Janeiro. 2005. pp580.
- AKBAR, A. N. e SALMON, M. Cellular Environments and Apoptosis: Tissue Microenvironments Control Activated T-Cell Death. **Immunol Today**, 1997; v.18, n.2, Feb, p.72-76.
- AKBAR, A. N.; BORTHWICK, N. J.; WICKREMASINGHE, R. G.; PANAYOITIDIS, P.; PILLING, D.; BOFILL, M.; KRAJEWSKI, S.; REED, J. C. e SALMON, M. Interleukin-2 Receptor Common Gamma-Chain Signaling Cytokines Regulate Activated T Cell Apoptosis in Response to Growth Factor Withdrawal: Selective Induction of Anti-Apoptotic (Bcl-2, Bcl-Xl) but Not Pro-Apoptotic (Bax, Bcl-Xs) Gene Expression. **Eur J Immunol**, 1996; v.26, n.2, Feb, p.294-299.
- ANDREWS BS, EISENBERG RA, THEOFILOPOULOS AN, IZUI S, WILSON CB, MCCONAHEY PJ, MURPHY ED, ROTHS JB, DIXON FJ. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. **J Exp Med** 1978; 148: 1198-1215.
- ANDREWS BS, EISENBERG RA, THEOFILOPOULOS NA, IZUI S, WILSON CB, MCCONAHEY PJ, MURPHY ED, ROTHS JB, DIXON FJ. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. **J Exp Med** 1978; 148: 1198-1215.
- AOKI K, KUROOKA M, CHEN JJ, PETRYNIAK J, NABEL GJ. Extracellular matrix interacts with soluble CD95L: retention and enhancement of cytotoxicity. **Nat Immunol** 2001; 2: 333-337.
- ASAKURA A & RUDNICK MA. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. **Exp Hematol** 2002; 30: 1339-1345.
- BAQI N, MOAZAMI S, SINGH A, AHMAD H, BALACHANDRA S, TEJANI A. Lupus nephritis in children: a longitudinal study of prognostic factors and therapy. **J Am Soc Nephrol** 1996;7:924–929.
- BI LL, PAN G, ATKINSON TP, ZHENG L, DALE JK, MAKRIS C, REDDY V, MCDONALD JM, SIEGEL RM, PUCK JM, LENARDO MJ, STRAUS SE. Dominant inhibition of Fas-ligandmediated apoptosis due to a heterozygous

- mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) type Ib. **BMC Medical Genetics** 2007; 8: 41-54.
- BICKERSTAFF MCM, BOTTO M, HUTCHINSON WL, HERBERT J, TENNENT GA, BYBEE A, MITCHELL DA, COOK HT, BUTLER PJG, WALPORT MJ, PEYPS MB. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and autoimmunity. **Nat med** 1999; 5: 694-697.
- BIELSCHOWSKY M, HELYER BJ, HOWIE JB. Spontaneous haemolytic anaemia in mice of the NZB/Bl strain . **Proc Univ Otago Med Sch (NZ)** 1959; 37: 911-918
- BOES M, SCHMIDT T, LINKEMANN K, BEAUDETTE BC, MARSHAK-ROTHSTEIN A, CHEN J. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:1184–1189.
- BOISE, L. H. e THOMPSON, C. B. Hierarchical Control of Lymphocyte Survival. **Science**, 1996; v.274, n.5284, Oct 4, p.67-68.
- BONO L, CAMERON JS, HICKS JA. The very long-term prognosis and complications of lupus nephritis and its treatment. **Quart J Med** 1999; 92: 19.
- BORGES VM, FALCÃO H, LEITE-JUNIOR JH, ALVIM L, TEIXEIRA GP, MOMTCHILLO R, NÓBREGA AF, LOPES MF, ROCCO PM, DAVIDSON WF, LINDEN R, YAGITA H, ZIN WA, DOSREIS GA. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. **J Exp Med** 2001; 194: 155-163.
- BORGES VM, LOPES MF, FALCÃO H, LEITE-JUNIOR JH, ROCCO PRM, DAVIDSON WF, LINDEN R, ZIN WA, DOSREIS GA. Apoptosis underlies immunopathogenetic mechanisms in acute silicosis. **Am J Resp Cell Mol Biol** 2002; 27: 78-84.
- BRAZELTON TR, NYSTROM M, BLAU HM. Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells. **Dev Biol**. 2003 Oct 1;262(1):64-74.
- BROEKEMA M, HARMSEN MC, KOERTS JA, PETERSEN AH, VAN LUYN MJA, NAVIS G, POPA ER. Determinants of tubular bone marrow-derived cell engraftment after renal ischemia/reperfusion in rats. **Kidney Int** 2005; 68: 2572–2581.

BRUNNER M, GREINIX HT, REDLICH K, KNÖBL P, SMOLEN J, LEITNER G, DERFLER K, GRANINGER W, KALHS P, MACHOLD K. Autologous blood stem cell transplantation in refractory systemic lupus erythematosus with severe pulmonary impairment. **Arthritis Rheum** 2002; 46: 1580-1584.

BURT R, TRAYNOR A, STATKUTE L, BARR W, ROSA R, SCHROEDER J, VERDA L, KROSNJAR N, QUIGLEY K, YAUNG K, VILLA M, TAKAHASHI M, JOVANOVIC B, OYAMA Y. Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. **JAMA** 2006; 295: 527-535.

CAMARGO FD, GREEN R, CAPETENAKI Y, JACKSON KA, DOODELL MA. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. **Nat Med** 2003; 9: 1520- 1527.

CAVALLO T, GRANHOLM NA. Accelerated (proliferative) lupus nephritis. **Am J Pathol** 1990; 137: 1549-1551.

CERADINI DJ, KULKARNI AR, CALLAGHAN MJ, TEPPER OM, BASTIDAS N, KLEINMAN ME, CAPLA JM, GALIANO RD, LEVINE JP, GURTNER GC. Progenitor cell tracking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. **Nature Med** 2004;10:858–64.

COHEN PL & EISENBERG RA. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. **Annu Rev Immunol** 1991; 9: 243-269.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Princípios éticos na experimentação animal. São Paulo: **Colégio brasileiro de experimentação animal**. 1991.

CONLON PJ, FISCHER CA, LEVESQUE MC, SMITH SR, ST CLAIR EW, ALLEN NB, FLEMING JA, HOWELL DN. Clinical, biochemical and pathological predictors of poor response to intravenous cyclophosphamide in patients with proliferative lupus nephritis. **Clin Nephrol** 1996;46:170–175.

COSGROVE, D., MEEHAN, D. T., GRUNKEMEYER, J. A., KORNAK, J. M., SAYERS, R., HUNTER, W. J. & SAMUELSON, G. C. (1996) **Genes Dev**. 10, 2981–2992.

D'AGATI VD. Renal disease in systemic lupus erythematosus, mixed connective tissue disease, Sjögren's syndrome, and rheumatoid arthritis. In: JC

Jennette, JL Olson, MM Schwartz, FG Silva. **Heptinstall's Pathology of the kidney**. Lippincott Williams & Wilkins, Second edition. 2007. pp. 517-612.

DAR A, KOLLET O, LAPIDOT T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. **Exp Hematol** 2006; 34: 967-975

DAVIDSON WF, HOLMES KL, ROTHS JB, MORSE HC III. Immunologic abnormalities of mice bearing the *gld* mutation suggest common pathway for murine nonmalignant lymphoproliferative disorders with autoimmunity. **PNAS** 1985; 82: 1219-1223.

DAVIDSON WF, HOLMES KL, ROTHS JB, MORSE III HC. Immunologic abnormalities of mice bearing the *gld* mutation suggest a common pathway for murine nonmalignant lymphoproliferative disorders with autoimmunity. **Proc Natl Acad Sci USA** 1985; 82: 1219-1223.

DEKEL B, SHEZEN E, TOV-FRIEDMAN SE, KATCHMAN H, MARGALIT R, NAGLER A, REISNER Y. Transplantation of human hematopoietic stem cells into ischemic and growing kidneys suggests a role in vasculogenesis but not tubulogenesis. **Stem Cells** 2006; 24: 1185-1193.

DEKEL B, ZANGI L, SHEZEN E, REICH-ZELIGER S, EVENTOV-FRIEDMAN, KATCHMAN H, JACOB-HIRSCH J, AMARIGLIO N, RECHAVI G, MARGALIT R, REISNER Y. Isolation and characterization of nontubular Sca-1+ Lin- multipotent stem/progenitor cells from adult mouse multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. **J Am Soc Nephrol** 2006; 17: 3300-3314.

DONADIO JV JR, HART GM, BERGSTRALH EJ et al. Prognostic determinants in lupus nephritis: a long-term clinicopathologic study. **Lupus** 1995;4:109-15.

DOOLEY MA, HOGAN S, JENNETTE C, FALK R. Cyclophosphamide therapy for lupus nephritis: Poor renal survival in black americans. **Kidney Int** 1997;51:1188-95.

DUFFIELD JS, PARK KM, HSIAO LL, KELLEY VR, SCADDEN DT, ICHIMURA T, BONVENTRE JV. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. **J Clin Invest** 2005; 115: 1743-1755.

- EGERTON M, SCOLLAY R, SHORTMAN K. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1990 Apr;87(7):2579-2582.
- EHRENSTEIN MR, KATZ DR, GRIFFITHS MH, PAPADAKI L, WINKLER TH, KALDEN JR, ISENBERG DA.. Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce Proteinuria in SCID mice. **Kidney Int** 1995; 48: 705-711.
- ESDAILE JM. Prognosis in systemic lupus erythematosus. Springer Sem **Immunopathol** 1994; 16: 337-355.
- FANG TC, ALISSON MR, COOK HT, JEFFREY R, WRIGHT NA, POULSOM R. Proliferation of bone marrow-derived cells contributes to regeneration after folic acid-induced acute tubular injury. **J Am Soc Nephrol** 2005; 16: 1723-1732.
- FIEHN C, HAJJAR Y, MUELLER K, WALDHERR R, HO AD, ANDRASSY K. Improved clinical outcome of lupus nephritis during the past decade: importance of early diagnosis and treatment. **Ann Rheum Dis** 2003; 62: 435-439.
- FRAENKEL L, MACKENZIE T, JOSEPH L, KASHGARIAN M, HAYSLETT JP, ESDAILE JM. Response to treatment as a predictor of longterm outcome in patients with lupus nephritis. **J Rheumatol** 1994; 21: 2052-2057.
- FU S, LIESVELD J. Mobilization of hematopoietic stem cells. **Blood Rev** 2000; 14(4): 205-218
- GAIPL US, REINHARD E. VOLLBRE, SHERIFF A , FRANZA S, KALDEN JR, HERRMANN M. Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews** 2005; 4: 189– 194.
- GOODELL MA, MCKINNEY-FREEMAN S, CAMARGO FD. Isolation and characterization of side population cells. **Methods Mol Biol** 2005; 290: 343-352.
- GREEN DR e SCOTT DW. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. **Curr Opin Immunol Review** 1994 Jun;6(3):476-87.
- GRUPPO ITALIANO PER LO STUDIO DELLA NEFRITE LUPICA (GISNEL). Lupus nephritis: Prognostic factors and probability of maintaining life

- supporting renal function 10 years after the diagnosis. **Am J Kidney Dis** 1992;19:473–479.
- GUO JK, SCHEDL A, KRAUSE DS. Bone marrow transplantation can attenuate the progression of mesangial sclerosis. **Stem Cells**. 2006 Feb;24(2):406-15. Epub 2005 Sep 8.
- 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; 62: 1285-1290.
- HELYER BJ e HOWIE JB. Renal disease associated with positive lupus erythematosus tests in a cross-bred strain of mice. **Nature** 1963 Jan 12;197:197.
- HIKARU SUGIMOTO, THOMAS M. MUNDEL, MALIN SUND, LIANG XIE, DOMINIC COSGROVE, e RAGHU KALLURI. Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. **PNAS** 2006 103: 7321-7326; published online before print April 28 2006,
- HISHIKAWA K, MARUMO T, MIURA S, NAKANISHI A, MATSUZAKI Y, SHIBATA K, KOHIKE H, KOMORI T, HAYASHI M, NAKAKI T, NAKAUCHI H, OKANO H, FUJITA T. Leukemia inhibitory factor induces multi-lineage differentiation of adult stem-like cells in kidney via kidney-specific cadherin 16. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 2005; 328: 288–291
- HOCHBERG MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** 1997; 40: 1725-1725
- HOWIE JB e HELYER BJ. The immunology and pathology of NZB mice. **Adv. Immunol** 1968; 9:215-266
- HUDSON BG, TRYGGVASON K, SUNDARAMOORTHY M, NEILSON EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. **N Engl J Med. Review** 2003 Jun 19;348(25):2543-56.
- IKARASHI K, LI B, SUWA M, KAWAMURA K, MORIOKA T, YAO J, KHAN F, UCHIYAMA M, OITE T. Bone marrow cells contribute to regeneration of damaged glomerular endothelial cells. **Kidney Int** 2005; 67: 1925-1933.

- IKEHARA S, YASUMIZU R, INABA M, IZUI S, HAYAKAWA K, SEKITA KI, TOKI J, SUGIURA K, IWAI H, NAKAMURA T, MUSO E, HAMASHIMA Y, GOOD RA. Long-term observations of autoimmune-prone mice treated for autoimmune disease by allogeneic bone marrow transplantation. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989; 86: 3306- 3310.
- IMAI H, HAMAI K, KOMATSUDA A, OHTANI H, MIURA AB. IgG subclasses in patients with membranoproliferative glomerulonephritis, membranous nephropathy, and lupus nephritis. **Kidney Int** 1997; 51: 270-276.
- IMASAWA T, UTSUNOMIYA Y, KAWAMURA T, ZHONG Y, NAGASAWA R, OKABE M, MARUYAMA N, HOSOYA T, OHNO T. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. **J Am Soc Nephrol** 2001; 12: 1401-1409.
- ISHIDA T, INABA M, HISHA H, SUGIURA K, ADACHI Y, NAGATA N, OGAWA R, GOOD RA, IKEHARA S. Requirement of donor-derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation. **J Immunol** 1994; 152: 3119-3127.
- ITO T, SUZUKI A, IMAI E, OKABE M, HORI M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. **J Am Soc nephrol** 2001; 12: 2625-2635.
- IWAI H, LEE S, INABA M, BABA S, YAMASHITA T, IKEHARA S. Bone marrow transplantation as a strategy for the treatment of autoimmune hearing loss in MRL/Mp-lpr/lpr mice. **J Neuroimmunol** 2005; 168: 76-82.
- IZUI S, LAMBERT PH, FOURNIÉ GJ, TÜRLER H, MIESCHER PA. Features of systemic lupus erythematosus in mice injected with bacterial lipopolysaccharides. Identification of circulating DNA and renal localization of DNA anti-DNA complexes. **J Exp Med** 1977; 145: 1115-1130.
- JYONOUCHI H, KINCADE PW, GOOD RA, FERNANDES GJ. Reciprocal transfer of abnormalities in clonable B lymphocytes and myeloid progenitors between NZB and DBA/2 mice. **J Immunol** 1981; 127: 1232-1235.
- KAKKANAI AH VN, MACDONALD GC, COHEN PL, EISENBERG RA. Suppression and reversal of glomerular disease by parabiosis with normal mice. **Clin Immunol Immunopathol** 1996; 78: 6-13.

- KALLURI R., SHIELD C, TODD P., HUDSON B, NEILSON E. Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. **J Clin Invest.** 1997 May 15; 99(10): 2470–2478.
- KARRAY S, KRESS C, CUVELLIER S, HUE-BEAUVAIS DD, BABINET C, LÉVI-STRAUSS M. Complete loss of fas ligand gene causes massive lymphoproliferation and early death, indicating a residual activity of gld allele. **J Immunol** 2004; 172: 2118-2125.
- KARUSSIS DM, VOURKA-KARUSSIS U, LEHMANN D, ABRAMSKY O, BEN-NUN A. Immunomodulation of autoimmunity in MRL/lpr mice with syngeneic bone marrow transplantation (SBMT). **Clin Exp Immunol** 1996; 100: 111-117.
- KATAGIRI T, COHEN PL, EISENBERG RA. The lpr gene causes an intrinsic T cell abnormality that is required for hyperproliferation. **J Exp Med** 1988; 167: 741-751.
- KELLEY VE e ROTHS JB. Interaction of mutant lpr gene with background strain influences renal disease. **Clin Immunol Immunopahtol** 1985; 37: 220-229.
- KISHIMOTO H, SURH CD, SPRANT J. A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. **J Exp Med** 1998; 187: 1427-1438.
- KRAMMER PH. CD95 (APO-1/Fas) –mediated apoptosis: live and let die. **Adv Immunol** 1999; 71: 163-210.
- KRAMMER PH. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature** 2000; 407: 789-795.
- KRAMPERA M, PASINI A, PIZZOLO G, COSMI L, ROMAGNANI S, ANNUNZIATO F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. **Cur Op Pharmacol** 2006, 6:1–7.
- KRAMPERA M, PASINI A, RIGO A, SCUPOLI MT, TECCHIO C, MALPELI G, SCARPA A, DAZZI F, PIZZOLO G, VINANTE F: HB-EGF/HER-1 signalling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multi-lineage differentiation. **Blood** 2005, 106:59-66.
- KRAUS DS, THEISE ND, Collector MI et al. Multiorgan, multilineage, engraftment by a single bone marrow derived stem cell. **Cell** 2001; 105: 369-377.

- KUCIA M, WOJAKOWSKY W, RECA R, MACHALINSKI B, GOZDZIK J, MAJKA M, BARAN J, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF1-, HGF-, and LIF-dependent manner. **Arch Immunol Ther Exp** 2006; 54: 121-135.
- KUNTER U, RONG S, DJURIC Z, BOOR P, MÜLLER-NEWEN G, YU D, FLOEGE J. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. **J Am Soc Nephrol** 2006; 17: 2202-2212.
- LAGASSE E, CONNORS H, AL DHALIMY M et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. **Nat Med** 2006: 1229-1234.
- LAGRESLE C, MONDIÈRE P, BELLA C, KRAMMER PH, DEFRANCE T. Concurrent engagement of CD40 and the antigen receptor protects naive and memory human B cells from APO-1/Fas-mediated apoptosis. **J Exp Med**. 1996 Apr 1;183(4):1377-1388.
- LAMBERT PH & DIXON FJ. Pathogenesis of the glomerulonephritis of NBZ/W mice. **J Exp Med** 1968; 127: 507-522.
- LANG TJ, NGUYEN P, PAPADIMITRIOU JC, Via CS. Increased severity of murine lupus in female mice is due to enhanced expansion of pathogenic T cells. **J Immunol** 2003; 171: 5795-5801.
- LAPIDOT T, PETIT I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. **Exp Hematol** 2002; 30: 973-981.
- LE BLANC K, TAMMIK L, SUNDBERG B, HAYNESWORTH SE, RINGDEN O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. **Scand J Immunol** 2003, 57:11-20.
- LEE HO, FERGUSON TA.. Biology of FasL. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2003 Jun-Aug;14(3-4):325-35.
- LEE RH, SEO MJ, REGER RL, SPEES JL, PULIN AA, OLSON SD, PROCKOP DJ. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. **PNAS** 2006; 103: 17438-17443.

- LENARDO, M. J. Fas and the Art of Lymphocyte Maintenance. **J Exp Med**, v.183, n.3, Mar 1, p.721-4. 1996.
- LI B MORIOKA T, UCHIYAMA M, OITE T. Bone marrow infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat model. **Kidney Int** 2006; 59: 323-330.
- LIN F, CORDES K, LI L, HOOD L, COUSER WG, SHANKLAND SJ, IGARASHI P. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia/reperfusion injury in mice. **J Am Soc Nephrol** 2003; 14: 1188-1199.
- LIN F, MORAN A, IGARASHI P. Intrarenal cells, not bone marrow –derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. **J Clin Invest** 2005; 115: 1756-1764.
- LORENZ, H. M.; HIERONYMUS, T.; GRUNKE, M.; MANGER, B. e KALDEN, J. R. Differential Role for Il-2 and Il-15 in the Inhibition of Apoptosis in Short-Term Activated Human Lymphocytes. **Scand J Immunol**, 1997 v.45, n.6, Jun, p.660-9.
- LYNCH DH, RAMSDELL F, ALDERSON MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. **Immunol Today** 1995; 16: 569-574.
- MACGOWAN JR, ELLIS S, GRIFFITHS M, ISENBERG DA. Retrospective analysis of outcome in a cohort of patients with lupus nephritis treated between 1977 and 1999. **Rheumatology (Oxford)**. 2002 ;41: 981-7.
- MAESHIMA A, YAMASHITA S, NOJIMA Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. **J Am Soc Nephrol** 2006; 2003; 14: 3138-3146.
- MARMONT MM. Immunoablation with stem cell rescue: a possible cure for systemic lupus erythematosus. **Lupus** 1993; 2: 151-156.
- MASUYA M, DRAKE CJ, FLEMING PA, REILLY CM, ZENG H, HILL WD, MARTIN-STUDDART A, HESS DC, OGAWA M. Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. **Blood** 2003;101: 2215-2218.
- MATIBA B, MARIANI SM, KRAMMER PH. The CD95 system and the death of a lymphocyte. **Semin Immunol** 1997; 9: 59-68.

MERRELL M, SHULMAN LE. Determination of prognosis in chronic disease illustrated by systemic lupus erythematosus. **J Chronic Dis** 1955;1:12-32.

MEZEY E, CHANDROSS KJ, HARTA G et al. **Science** 2000; 290 : 1779-1782.

MILICH DR e GERSHWIN ME. The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand mice. In: Immunologic defects in laboratory animals 2. **Ed: ME Gershwin & B Merchant. Plenum Publishing Co**, 1981; New York; pp. 77-123.

MOLLURA DJ, HARE JM, RABB H. Stem cell therapy for renal diseases. **Am J Kidney Dis** 2003; 42: 891-905.

MORIGI M, IMBERTI B, ZOJA C, CORNA D, TOMASONI S, ABBATE M, ROTTOLI D, ANGIOLETTI S, BENIGNI A, PERICO N, ALISON M, REMUZZI G. Mesenchymal stem cells are renotrophic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. **J Am Soc nephrol** 2004; 15: 1794-1804.

MURPHY ED e ROTH JB. A single-gene model for massive lymphoproliferation with autoimmunity in new mouse strain MRL. **Fed Proc** 1977; 36: 1246-1246

MURPHY ED e ROTH JB. A Y-chromosome-associated factor producing accelerated autoimmunity and lymphoproliferation in strain BXSB. **Arthritis Rheum** 1979; 22: 1188-1194.

NAGATA S. Apoptosis by death factor. **Cell** 1997; 88: 355-365.

NAPIREI M, KARSUNKY H, ZEVIK B, STEPHAN H, MANNHERZ HG, MÖRÖY T. Features of systemic lupus erythematosus in DNase 1-deficient mice. **Nat Genet** 2000; 25: 177-314.

NILSSON SK, DOONER MS, QUESENBERRY PJ. Synchronized cell-cycle induction of engrafting long-term repopulating stem cells. **Blood**. 1997 Dec 1;90(11):4646-4650.

NINICHUK V, GROSS O, SEGERER S, HOFFMANN R, RADOMSKA E, BUCHSTALLER A, HUSS R, AKIS N, SCHLÖNDORFF D, ANDERS H-J. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. **Kidney Int** 2006; 70: 121-129.

- NOSSAL GJV. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 1994; 72: 229-239. Scollay RG, Butcher EC, Weismann II. **Eur J Immunol** 1980; 10: 210-218.
- NOSSENT JC. End stage renal disease in patients with systemic lupus erythematosus. In: Lewis EJ, ed. *Lupus nephritis*. **Oxford: University Press**, 1999.
- OATES JC, GILKESON GS. Mediators of injury in lupus nephritis. **Curr Opin Rheumatol** 2002; 14: 498-503.
- 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; 114: 795-804.
- ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature** 2001; 410: 701-705.
- PALAPATTU GS, MEEKER A, HARRIS T, COLLECTOR MI, SHARKIS SJ, DEMARZO AM, WARLICK C, DRAKE CG, NELSON WG. Epithelial architectural destruction is necessary for bone marrow derived cell contribution to regenerating prostate epithelium. **J Urol**. 2006 Aug;176(2):813-818
- PALMER E. Negative selection – clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. **Nat Rev Immunol** 2003; 3: 383-391.
- PERNIS AB. Estrogen and CD4+ T cells. **Curr. Opin. Rheumatol**. 2007 Sep;19(5): 414-420.
- PETER ME, BUDD RC, DESBARATS J, HEDRICK SM, HUEBER AO, NEWELL MK, OWEN LB, POPE RM, TSCHOPP J, WAJANT H, WALLACH D, WILTROUT RH, ZÖRNIG M, LYNCH DH. The CD95 receptor: apoptosis revisited. **Cell** 2007; 129: 447-450.
- PISETSKY DS, JELINEK DF, MCANALLY LM, REICH CF, LIPSKY PE. In vitro autoantibody production by normal adult and cord blood B cells. **J Clin Invest** 1990;85:899–903.
- PONTICELLI C. New therapies for lupus nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1: 863-868.

- POULSOM R, FORBES SJ, HODIVALA-DILKE K, RYAN E, WYLES S, NAVARATNARASAH S, JEFFERY R, HUNT T, ALISON M, COOK T, PUSEY C, WRIGHT NA. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. **J Pathol** 2001; 195: 229-235.
- RAMSDELL F, SEAMAN MS, MILLER RE, TOUGH TW, ALDERSON MR, LYNCH DH. Gld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas. **Eur J Immunol** 1994; 24: 928-933.
- RANGEL A, MENDES R, CLAPAUCH R, BARROS J, LORDELLO S. Síndrome de Klinefelter associada a lúpus Eritematoso Sistêmico. Interferência dos esteróides sexuais. **Arg. Bras. Endocrinol. Metab** 2002. Vol 46 São Paulo nº 3: 299-305.
- RIEMEKASTEN G & HAHN BH. Key autoantigens in SLE. **Rheumatology** 2005; 44: 975-982.
- RIOUX JD, ABBAS AK. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. **Nature**. 2005 Jun 2;435(7042):584-589
- ROOKMAAKER MB, SMITS AM, TOLBOOM H, VAN'T WOUT K, MARTENS AC, GOLDSCHMEDING R, JOLLES JA, VAN ZONNEVELD J, GRÖNE HJ, RABELINK TJ, VERHAAR MC. Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis. **Am J Pathol** 2003; 163: 553-562.
- ROTHS JB, MURPHY ED, EICHER EM. A new mutation, gld that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. **J Exp Med** 1984; 159: 1-20.
- ROUBINIAN JR, PAPOIAN R, TALAL N. Androgenic hormones modulate autoantibody responses and improve survival in murine lupus. **J Clin Invest** 1977 Jun;59(6):1066-70.
- ROUBINIAN JR, TALAL N, GREENSPAN JS, GOODMAN JR, SIITERI PK. Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. **J Exp Med** 1978; 147: 1568-1583.
- ROUFOSSE CA, DIREKZE NC, OTTO WR, WRIGHT NA: Circulating mesenchymal stem cells. **Int J Biochem Cell Biol** 2004, 36:585-597.

- RUS V, HOCHBERG MC: The epidemiology of systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH. **Dubois' lupus erythematosus**. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002; 65-83.
- RUSSELL JH. Activation induced death of mature T cells in the regulation of immune responses. **Curr Opin Immunol** 1995; 7: 382-388
- SABELKO-DOWNES e RUSSELL JH. The role of Fas ligand in vivo as a cause and regulator of pathogenesis. **Curr Opin Immunol** 2000; 12: 330-335.
- SAGRINATI C, NETTI GS, MAZZINGHI B, LAZZERI E, LIOTTA F, FROSALI F, RONCONI E, MEINI C, GACCI M, SQUECCO R, CARINI M, GESUALDO L, FRANCINI F, MAGGI E, ANNUNCIATO F, LASAGNI L, SERIO M, ROMAGNANI S, ROMAGNANI P. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. **J Am Soc Nephrol** 2006; 17: 2443-2456.
- SALMON, R. A.; FOLTZ, I. N.; YOUNG, P. R. e SCHRADER, J. W. The P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Activated by Ligation of the T or B Lymphocyte Antigen Receptors, Fas or Cd40, but Suppression of Kinase Activity Does Not Inhibit Apoptosis Induced by Antigen Receptors. **J Immunol**, v.159, n.11, Dec 1, 1997, .5309-5317.
- SCHNEIDER P, HOLLER N, BODMER JL et al. Conversion to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. **J Exp Med** 1998; 187: 1205-1213.
- SCHULZE-OSTHOFF K, FERRARI D, LOS M, WESSELBORG S, PETER ME. Apoptosis signaling by death receptors. **Eur J Biochem** 1998; 254: 439-459.
- SELDIN MF, MORSE HC III, REEVES JP, SCRIBNER CL, LEBOEUF RC, STEINBERG AD. Genetic analysis of autoimmune gld mice. I. Identification of a restriction fragment length polymorphism closely linked to the gld mutation within a conserved linkage group. **J Exp Med** 1988; 167: 688-693.
- SHIRAI T e HIROSE S. Molecular pathogenesis of SLE. **Springer Semin Immunol** 2006; 28: 79-82.
- SILVA ML, CHAGASTELLES PC, NARDI NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Science** 2006; 119: 2204-2213.

- SINGH RR, SAXENA V, ZANG S, LI L, FINKELMAN FD, WITTE DP, JACOB CO.. Differential contribution of IL-4 and STAT6 vs STAT4 to the development of lupus nephritis. **J Immunol** 2003; 170: 4818-4825
- SOBEL ES, KAKKANAI AH VN, COHEN PL, EISENBERG RA. Correction of gld autoimmunity by co-infusion of normal bone marrow suggests that gld is a mutation of the Fas ligand gene. **Int Immunol** 1993; 5: 1275-1278.
- SOBEL ES, KAKKANAI AH VN, KAKKANAI AH M, COHEN PL, EISENBERG RA. Co-infusion of normal bone marrow partially corrects the gld T-cell defect. Evidence for an intrinsic and extrinsic role for Fas ligand. **J Immunol** 1995; 154: 459-464.
- SOBEL ES, KATAGIRI T, KATAGIRI K, MORRIS SC, COHEN PL, EISENBERG RA. An intrinsic B cell defect is required for the production of autoantibodies in the lpr model of murine systemic autoimmunity. **J Exp Med** 1991; 173: 1441-1449
- SOBEL ES, COHEN PL, EISENBERG RA. Lpr T cells are necessary for autoantibody production in lpr mice. **J Immunol** 1993 May 1;150(9): 4160-4167
- SPRANT J e KISHIMOTO H. The thymus and central tolerance. **Phil Trans R Soc Lond B** 2001; 356: 609-616.
- SPRANT J e KISHIMOTO H. The thymus and negative selection. **Immunol Rev** 2002; 185: 126-135.
- STARR TK, JAMESON SC, HOGQUIST KA. Positive and negative T cell selection. **Ann Rev Immunol** 2003; 21: 139-176.
- STATKUTE L, TRAYNOR A, OYAMA Y, YAUNG K, VERDA L, KROSNJAR N, BURT R. Antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus treated by autologous haematopoietic stem cell transplantation. **Blood** 2005; 106: 2700-2709.
- SUDA T, HASHIMOTO H, TANAKA M, OCHI T, NAGATA S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T Lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. **J Exp Med** 1997; 186: 2945-2050.

- SUDA T, TAKAHASHI T, GOLDSTEIN P, NAGATA S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell** 1993; 75: 1169-1178.
- 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. **PNAS** 2006; 103: 7321-7326.
- TAKAHASHI T, TANAKA M, BRANNAN CI, JENKINS NA, COPELAND NG, SUDA T, NAGATA S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. **Cell** 1994; 76: 969-976.
- TAKEUCHI K, INABA M, MIYASHIMA S, OGAWA R, IKEHARA S. A new strategy for treatment of autoimmune diseases in chimeric resistant MRL/lpr mice. **Blood** 1998; 91: 4616-4623.
- TAKI S, HIROSE S, KINOSHITA K, NISHIMURA H, SHIMAMURA T, HAMURO J, SHIRAI T. Somatically mutated IgG anti-DNA antibody clonally related to germ-line encoded IgM anti-DNA antibody. **Eur J Immunol** 1992;22:987-992.
- TANG S, LUI SL, LAI KN. Pathogenesis of lupus nephritis: an update. **Nephrology** 2005; 10: 174-179.
- TÖGEL F, ISAAC J, HU Z, WEISS K, WESTENFELDER C. Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. **Kidney Int** 2005; 676: 1772-1784.
- TÖGEL F, WEISS K, YANG Y, HU Z, ZHANG P, WESTENFELDER C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. **Am J Physiol Renal Physiol** 2007; 292: F1626-1635
- TOMITA S, LI R-K, WEISEL RD et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. **Circulation** 1999; 100 (suppl) II: 247-256.
- TRAYNOR AE, BARR WG, ROSA RM et al. Haematopoietic stem cell transplantation for severe and refractory lupus: analysis after five years and fifteen patients. **Arthritis Rheum** 2002; 46: 2917-2923.

- TRAYNOR AE, BURT RK. Haematopoietic stem cell transplantation for active systemic lupus erythematosus. **Rheumatology** 1999; 38: 767-772.
- TRAYNOR AE, SCHROEDER J, ROSA RM, CHENG D, STEFKA J, MUJAIS S et al. Treatment of severe systemic lupus with high dose chemotherapy and haematopoietic stem cell support. **Lancet** 2000; 356: 701-707.
- TSCHOPP J, IRMLER M, THOME M. Inhibition of Fas death signals by FLIPs. **Curr Opin Immunol** 1998; 10: 552-558.
- TYNDALL A e GRATWOHL A. Blood and marrow stem cell transplants in autoimmune disease. A consensus report written on behalf of the European League against rheumatism (EULAR) and the European group for blood and marrow transplantation (EBMT). **Br J Rheum** 1997; 36: 390-392.
- UROWITZ MB, GLADMAN DD, ABU-SHAKRA M, FAREWELL VT. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. III. Improved survival over 24 years. **J Rheumatol**. 1997 Jun;24(6):1061-1065.
- VAN PARIJS L. ABBAS A Homeostasis and Self-Tolerance in the Immune System: Turning Lymphocytes Off. **Science**, 1998 v.280, n.5361, Apr 10, p.243-248.
- VAN PARIJS L., ABBAS A. Role of Fas-Mediated Cell Death in the Regulation of Immune Responses. **Curr Opin Immunol**, 1996 v.8, n.3, Jun, p.355-361.
- VON BOEHMER H. Positive selection of lymphocytes. **Cell** 1994; 76: 219-228.
- WALKER SE, BESCH-WILLIFORD CL, KEISLER DH. Accelerated deaths from systemic lupus erythematosus in NZB x NZW F1 mice treated with the testosterone-blocking drug flutamide. **J Lab Clin Med**. 1994 Sep;124(3):401-407.
- WANG B, YAMAMOTO Y, EL-DADRI N, GOOD RA. Effective treatment of autoimmune disease and progressive renal disease by mixed bone-marrow transplantation that establishes a stable mixed chimerism in BXSB recipient mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96: 3012-3016.
- WARD MM. PYUN E, STUDENSKI S. Long-term survival in SLE: patients characteristics associated with poorer outcomes. **Arthritis Rheum** 1995; 38: 274-283

- WATANABE T, SAKAI Y, MIYAWAKI S, SHIMIZU A, KOIWAI O, OHNO K. A molecular genetic linkage map of mouse chromosome-19, including the *Ipr*, *Ly-44*, and *TdT* genes. **Biochem Genet** 1991;29: 325-336.
- WEBB S, MORRIS C, SPRENT J. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. **Cell**. 1990 Dec 21;63(6):1249-1256.
- WEENING JJ, D'AGATI VD, SCHWARTZ MM, SESHAN SV, ALPERS CE, APPEL GB, BALOW JE, BRUIJN JA, COOK T, FERRARIO F, FOGO AB, GINZLER EM, HEBERT L, HILL G, HILL P, JENNETTE JC, KONG NC, LESAVRE P, LOCKSHIN M, LOOI L-M, MAKINO H, MOURA LA, NAGATA M. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. **Kidney Intern** 2004; 65: 521-330.
- WEIMANN JM, CHARLTON CA, BRAZELTON TR, HACKMAN RC, BLAU HM. Contribution of transplanted bone marrow cells in Purkinje neurons in human adult brains. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100: 2088-2093.
- WERWITZKE S, TRICK D, KAMINO K, MATTHIAS T, KNIESCH K, SCHLEGELBERGER B, SCHMIDT RE, WITTE T. Inhibition of Lupus Disease by Anti-Double-Stranded DNA Antibodies of the IgM Isotype in the (NZB X NZW)F1 Mouse. **Arthritis & rheumatism** 2005; 52: 3629-3638
- WILSON A, TRUMP A. Bone-marrow haematopoietic stem-cell niches. **Nature Rev Immunol** 2006; 93-106.
- YUI K, WADSWORTH S, YELLEN A, HASHIMOTO Y, KOKAI Y, GREENE MI. Molecular and functional properties of novel T cell subsets in C3H-gld/gld and nude mice. Implications for thymic and extrathymic maturation. **Immunol Rev** 1988; 104: 121-155.
- ZHANG JQ, OKUMURA C, MCCARTY T, SHIN MS, MUKHOPADHYAY P, HORI M, TORREY TA, NAGHASHFAR Z, ZHOU JX, LEE CH, ROOPENIAN DC, MORSE III HC, DAVIDSON W. Evidence for a selective transformation of autoreactive immature plasma cells in mice deficient in FasL. **J Exp Med** 2004; 200: 1467-1478

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](#)