Ana Claudia Mallet de Souza Ramos

Células renais epiteliais como terapia celular na doença renal crônica.

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho -

Programa de Pós Graduação Strictu Senso em Medicina,

Para obtenção do Título de Mestre em Medicina

São Paulo

2013

Ana Claudia Mallet de Souza Ramos

Células renais epiteliais como terapia celular na doença renal crônica.

Tesedemestradoapresentadaao Programa dePós-GraduaçãoemMedicinada UniversidadeNovedeJulho,paraobtençãodotítulod eMestreemMedicina.
Orientador:Profa.Dra. Nádia K Guimarães de Souza
Co-orientador:Prof.Dr.Fellype Carvalho Barreto

São Paulo

2013

Ramos, Ana Claudia Mallet de Souza.

Células renais epiteliais como terapia celular na doença renal crônica.

São Paulo, 2013.

30p.

Tese (Mestrado) Universidade Nove de Julho. Programa de Pós Graduação Strictus Senso em Medicina.

1. Células renais epiteliais 2. Terapia celular 3. Doença renal Crônica

São Paulo, 17 de dezembro de 2013.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): Ana Cláudia Mallet de Souza Ramos

Título da Dissertação: "Células renais epiteliais como terapia celular na doença renal crônica"

Presidente: PROFA. DRA. Nádia Karina Guimarães de Souza _____

Membro: PROFA. DRA. Maria Aparecida Dalboni _____

Membro: PROF. DR. Fellype Barreto _____

Dedico esta tese, em meu nome e em nome da minha avó, à mais forte das mulheres;

Minha mãe querida e amada,

Maria Aparecida Mallet

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Nádia K Guimarães de Souza, professora Doutora da Disciplina do Mestrado, pela sua competência, sua dedicação à Universidade Nove de Julho e principalmente pela sua alta dose de paciência dispensada aos iniciantes na atividade cientifica.

Ao Prof. Dr. Bento Fortunato, professor doutor e coordenador do Centro de Diálise do Hospital Albert Einstein, pela compreensão e flexibilidade durante minha formação.

Ao Prof Dr José Osmar Medina que contribuiu de maneira fundamental para que este estudo fosse realizado.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr.Fellype Carvalho Barreto, pelo seu incentivo e convivência agradável durante seus plantões no Centro de Dialise Albert Einstein e por toda a acessoria científica dispensada na execução deste estudo.

Aos médicos plantonistas do Centro de diálise Einstein Dra Thais Nemoto, Dra Erika L. Naka, Dr Adriano Ammirat e Dra Maria Claudia C Andreolli, pela oportunidade de tê-los no meu caminho e acrescentar o meu conhecimento profissional.

A nutricionista e psicóloga Rosana Cardoso e Christiane Karan por todo incentivo e amizade.

Às secretárias do Setor de Diálise Albert Einstein Viviane Siqueira e Lenise, pelo apoio e paciência em me ouvir.

A equipe de enfermagem do Setor de Diálise Albert Einstein que me incentivavam, pelo interesse em meu progresso pessoal e científico.

Ao Laboratório da Uremia, 14 ^{0}Andar do Edifício Horácio Kneese de Melo, onde utilizamos espaço físico e equipamentos, mas principalmente o ambiente agradável e a convivência amistosa e questionamento científico que me permitiu avançar nesse estudo. Não cito nomes pelo risco da memória me trair e ser injusta com alguém que muito me ajudou.

Agradeço em especial ao Otoniel de Souza Ribas, “Totó” por toda a ajuda e resolução de questões práticas.

Agradeço em Especial ao Tarcísio Giffoni, pela consultoria técnica e por todo tempo dedicado a este estudo.

Agradeço em especial a Dra Maria Aparecida Dalboni, pela ajuda em todo o processo de execução deste projeto, bem como pelo conhecimento técnico científico que me ofereceu.

Lista de abreviaturas

NEP	Neprilisina
EPO	Eritropoietina
THP	Proteína de Tamm-Horsfall
FOXA3	Marcador de célula progenitora multipotente
OCT4	Marcador de célula progenitora multipotente
Alpha –SMA	Alpha-actina de músculo liso
FACS	Citometria de Fluxo

Sumário

Dedicatória.....iv

Agradecimentos.....v

Listas de abreviaturas.....viii

Resumo.....ix

1- Introdução.....1

2- Justificativa.....8

3- Objetivos.....9

4- Material e Métodos.....10

5- Resultados.....14

6- Discussão.....32

7- Conclusões.....37

8- Referências.....38

Células renais epiteliais como terapia celular na doença renal crônica.

Resumo

Introdução: A doença renal crônica é um problema mundial em crescimento nas últimas décadas.O rim tem a capacidade de se regenerar após isquemia-reperfusão e lesões tóxicas. Entretanto, em alguns insultos inicia o processo de transição epitelial-mesenquimal com consequente acúmulo de tecido fibrótico e perda da função. O melhor tratamento doença renal crônica é o transplante, porém existeescassez de órgãos.Potencialmente a terapia celular poderá retardar a progressão da doença renal em humanos tanto em rins nativos como em rins transplantados. Este estudo tem como objetivo avaliar células renais para terapia celular no tratamento da doença renal crônica.O objetivo central é avaliar a resposta celulara toxinas urêmicas especialmente o indoxil sulfato.

Métodos: Células renais foram obtida por método de digestão à partir de rins descartados do Hospital do Rim e Hipertensão, UNIFESP_EPM.Imunofluorescencia e citometria de fluxo(FACS) foram utilizados para caracterização de células. O indoxil sulfato foi utilizado para estimular lesão renal sendo avaliadas quanto a expressão de alpha-smooth muscle actin.

Resultados: Oito doadores foram incluídos neste estudo. Seis culturas foram continuadas. Os doadores apresentaram idade média de 46,25 anos, 100% fez uso de drogas vasoativas e 50% fez uso de drogas nefrotóxicas. O tempo de confluência na passagem zero foi de 7 dias e duplicação celular foi de 72 h. 3,3% das células da cultura primária são de túbulo proximal, 1,7% de túbulo distal, 4,6% fibroblastos produtores de EPO, 3,6% céulas mesenquimais e 8,9%progenitoras multipotentes. As células da cultura primária não tiveram seu fenótipo aletrado com o tratamento com indoxil sulfato.

Conclusões:Não houve alteração do fenótipo celular em resposta ao indoxil sulfato.

Cell therapy with human renal cells for chronic kidney disease

Abstract

Introduction: Chronic kidney disease is a worldwide growing problem. The kidney has the ability for nearly complete regenerate after ischemia/reperfusion or toxic injury. However, in some injuries the kidney undergoes epithelial-mesenchymal transition and fibrosis with loss of function. The best treatment is transplantation; nevertheless less than one third of patients are able to receive a kidney transplant due to lack of organs. Cell therapy may retard the progression of chronic kidney disease boht in allograft or in native kidney. This study aims to evaluate the feseabilty of a cell therapy. The main objective of this study is to evaluate the cell response to uremic toxins, specially indoxil sulfate.

Methods: Human kidney cells were obtained by digestion method from human kidneys discard from Hospital do Rim e Hipertensão, UNIFESP-EPM. Immunofluorescence technique and flow cytometry (FACS) were performed to characterize cells. Indoxil sulfate was used to stimulate injury FACS and immunofluorescence were performed to determine the expression of apha smooth muscle actin.

Results: Eight donors were included, only six cultrues were kept**.** Donors were 46,25 years old on avarage, 100% received vasoactive drugs and 50% received nefrotoxic drugs.Cells were kept for 7 days until confluency were obtain in the passage zero, for the other passages duplication time was 72h.In the primary culture, 3.3% were proximal tubule cells, 1.7% distal tubule cells, 4.6% were EPO producing fibroblasts, 3.6% were mesenchymal cells and 8.9% pluripotente stem cells. There were no changing on cells phenotype while indoxil sulfate were added to the cultures.

Conclusions:

Primary culture from deceased donors do not change phenotype when exposed to indoxil sulfato.

Introdução

A Doença renal crônica (DRC) é uma condição clinica multifatorial caracterizada por perda progressiva da função renal. Afeta mais de 10 milhões de brasileiros e a maioria desconhece a doença. (1, 2) Estimativas de 2011, da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), demonstram que 50.128 pacientes estão em tratamento dialítico, cuja cobertura terapêutica em 84,9% é realizada pelo SUS.(3)

A etiologia da DRC é em 35,1% dos casos secundária à hipertensão arterial sistêmica, 28,4% secundária ao diabetes mellitus, 11,4% decorrente de glomerulonefrites, 3,8% devido a rins policísticos e 21,3% não tem diagnóstico etiológico.(3)

Uma análise realizada pelo Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) estima que a prevalência de DRC nos Estados Unidos é de 13%. Esta prevalência elevada é decorrente do envelhecimento da população, aumento da incidência de hipertensão, diabetes, obesidade e doenças relacionadas. (1)

O rim tem como funções a homeostase do meio interno (através da manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico e ácido básico) e a produção de hormônios, tais como a vitamina D e a eritropoietina (EPO). A função de excreção de catabólitos é resultante da filtração glomerular e da secreção e reabsorção tubular. A DRC consiste em perda progressiva global dessas funções, que pode ser avaliada laboratorialmente pela medida do clearance de creatinina em urina de 24 horas.

O rim contém cerca de 1 milhão de néfrons, cada um com capacidade de formar urina. O néfron por sua vez é constituído por tufo de capilares glomerulares, formados por um enovelado de arteríolas envoltas pela membrana basal, além de

células mesangiais e podócitos, que mantém a formação e a capacidade de contração dessas arteríolas em reposta a hormônios específicos. Esse conjunto e a cápsula de Bowman são denominados glomérulos, e são responsáveis pela filtração de sangue. Cerca de 180 litros de sangue são filtrados por dia, formando o ultrafiltrado que é composto por plasma sem células e sem proteínas. A cápsula de Bowman drena para os túbulos proximais que reabsorvem cerca de 65%-85% dos eletrólitos e água. Após os túbulos proximais existe a alça de Henle, túbulos distais e ductos coletores que fazem também a reabsorção e secreção de eletrólitos, água e escórias nitrogenadas.

Em indivíduos saudáveis a filtração glomerular é de 110 a 120 ml por minuto, correspondente a função de filtração de cerca de 2.000.000 de néfrons.(4) Em pacientes com DRC a filtração se reduz podendo progredir e chegar ao quadro de anúria.

Os capilares glomerulares formam uma membrana filtrante constituída por três camadas:

1) Endotelial, onde ocorre o transporte intenso de fluidos através de fenestras. As células endoteliais com cargas negativas fixas impede a passagem de proteínas plasmáticas, mas permite passagem de água, sódio e pequenos solutos de tamanho semelhante aos poros, cerca de 70 nm.

2) Membrana basal glomerular, que como o endotélio apresenta cargas eletronegativas, é ausente de elementos celulares e envolve todo o endotélio, sendo constituída por uma rede de fibras colágenas e proteoglicanos, com amplos espaços pelos quais podem ser filtradas grandes quantidades de água e solutos, sendo uma barreira para proteínas.

3) Podócitos que são células diferenciadas e prolongadas com tentáculos, as pedicelas. Os espaços entre as pedicelas permitem a passagem do filtrado glomerular em alto fluxo de água e pequenos solutos, contribuindo para assegurar a continuidade da ultrafiltração glomerular.

O filtrado glomerular é denominado ultrafiltrado, e após sua formação nos glomérulos será processado pelos túbulos renais. As alterações na reabsorção tubular e na filtração glomerular são estreitamente coordenadas evitando assim a ocorrência de grandes flutuações na excreção urinária. Algumas substâncias como a glicose e os aminoácidos tem reabsorção quase completa a partir dos túbulos, de modo que sua excreção urinária é praticamente nula, por outro lado, produtos de degradação como ureia e creatinina são pouco reabsorvidos a partir dos túbulos e, portanto, são excretados em grande quantidade. (4)

Os túbulos proximais apresentam 65% da capacidade de reabsorção ativa e passiva do sódio, cloretos, bicarbonato e potássio filtrados e toda glicose. As células epiteliais do túbulo proximal são altamente metabólicas, tendo grande números de mitocôndrias para os potentes processos de transporte ativo e co-transporte. Além disso, as células tubulares proximais apresentam extensa borda em escova no lado apical da membrana, que, em seu conjunto forma extensa área de superfície, tanto nos lados luminal quanto basolateral do epitélio, permitindo o rápido transporte de íons de sódio e de outras substâncias.

A alça de Henle constituída por ramo descendente, ascendente delgado e ascendente espesso possui membranas epiteliais delgadas, sem borda em escova e poucas mitocôndrias com níveis mínimos de atividade metabólica e tem como função permitir a difusão simples de substâncias através de suas paredes e 20% de reabsorção

da água. A bomba de sódio potássio ATPase, que encontra-se nas membranas basolaterais, constitui componente fundamental na reabsorção de outros solutos no segmento espesso do ramo ascendente da alça de Henle.

Os túbulos distais finais e os túbulos coletores corticais são compostos por dois tipos celulares distintos: as células principais e as células intercaladas. As células principais reabsorvem sódio do lúmen e secretam íons potássio para o lúmen. As células intercaladas reabsorvem íons potássio e bicarbonato do lúmen e secretam íons hidrogênio para o mesmo. A reabsorção de água a partir desse segmento tubular é controlada pela concentração do hormônio antidiurético (ADH). Outras características funcionais do túbulo distal final e do túbulo coletor resumidamente são:

1) As membranas tubulares de ambos são quase totalmente impermeáveis à uréia.

2) A reabsorção é controlada por hormônios, particularmente a aldosterona. Ao mesmo tempo esses segmentos secretam íons potássio, a partir do sangue dos capilares peritubulares, para o lúmen tubular.

3) As células intercaladas desses segmentos do néfron secretam íons hidrogênio por um mecanismo ativo de hidrogênio-ATPase. Portanto, essas células desempenham papel chave na regulação do equilíbrio ácido-básico dos líquidos corporais.

4) A permeabilidade dos túbulo distal final e ducto coletor cortical à água é controlada pela concentração de ADH, também denominado vasopressina.

Como é essencial manter um balanço preciso entre a reabsorção tubular e a filtração glomerular existem múltiplos mecanismos de controle nervoso, hormonais e locais que regulam a reabsorção tubular, como ocorre para o controle da filtração

glomerular. Um aspecto importante da reabsorção tubular é o fato de que a reabsorção de alguns solutos pode ser regulada, independentemente da de outros, sobretudo através de mecanismos de controle hormonal.

O rim tem a capacidade de se regenerar após insultos como isquemia/reperfusão ou lesões tóxicas. Entretanto, em alguns insultos o rim inicia o processo de transição epitélio-mesenquimal com consequente acúmulo de tecido fibrótico e perda progressiva da função.(5, 6)

Acredita-se que a lesão tubular, tanto reversível quanto irreversível, constitua um evento primário resultando em vasoconstrição arteriolar associada à retroalimentação túbulo-glomerular envolvendo o mecanismo de renina-angiotensina. Outra teoria é baseada na disfunção endotelial com consequente aumento da endotelina e diminuição de óxido nítrico e de prostaglandina 1 e 2. (7)

Após uma injúria os néfrons remanescentes sofrem alterações adaptativas, que determinam aumento do fluxo sanguíneo, da filtração glomerular (FG) e do débito urinário desses néfrons. Isso resulta em hipertrofia (crescimento das várias estruturas desses néfrons), alterações funcionais que diminuem a resistência vascular e a reabsorção tubular dos néfrons remanescentes. Essas alterações adaptativas permitem excretar quantidade normal de água e de solutos mesmo com massa renal reduzida. Entretanto, todos esses fatores causam sobrecarga dos néfrons levando a maior lesão dos glomérulos, túbulos e interstício. (4, 8)

O aumento crônico da pressão e o estiramento das pequenas arteríolas desses glomérulos provoca esclerose vascular (substituição do tecido normal por tecido conjuntivo fibrótico). As alterações adaptativas nos néfrons remanescentes causam lenta e progressivamente a doença renal em estágio terminal.

Durante a progressão da doença renal com perda da capacidade de filtração ocorre o acúmulo de diversas substância na corrente sanguínea. A essas substâncias deu-se o nome de toxinas urêmicas, ou seja, moléculas de diferentes tamanhos que determinam sintomas sistêmicos da perda de função renal. Estudos recentes demonstraram que o indoxil sulfato, uma toxina urêmica, está elevada na doença renal crônica.(9,10) Estudos experimentais demonstraram que a inoculação desta substância em culturas celulares induziu à maior expressão de fatores de crescimento pró-fibróticos, como o TGF-beta e inibidor tecidual da metaloproteinase-l (11) e pró-colágeno alfa-1 (12, 13). Desta forma a síndrome urêmica, caracterizada pelo acúmulo de toxinas resultantes de produtos finais do catabolismo endógeno, tem um importante papel na patogênese dos sintomas e na progressão da DRC.(14, 15)

Os mecanismos de regeneração do rim também são incertos. Estudos recentes de Sagrinati e cols (16) demonstraram a presença de células com características de progenitoras na parede epitelial da cápsula de Bowman. Oliver e cols. descreveram células da mesma característica em papila renal. (17) Em outro estudo demonstrou-se que após insultos renais as células progenitoras da papila migram para as áreas de lesão, participando no processo regenerativo. (18) Células progenitoras são células capazes de se diferenciar em outros tipos celulares e tem tropismo por áreas de injúria. A terapia celular tem sido investigada e apresenta grande progresso para tratamento de deficiências e em especial para as doenças renais. (19, 20)

Atualmente, pacientes com doença renal crônica em estágio terminal tem como opções terapêuticas diálise e transplante. Entretanto, com o aumento da demanda por transplante renal existe insuficiência de doações e longa espera para receber um órgão. Apesar de ser uma terapêutica de extrema importância, não consiste em tratamento definitivo ou cura da doença renal. Após um período ocorre

perda do enxerto e retorno à terapia dialítica ou a necessidade de novo transplante renal.

A proposta deste estudo é avaliar a resposta à injúria de células renais humanas diferenciadas. Em estudo anterior Guimaraes-Souza e cols. (21) demonstraram a possibilidade de crescimento, expansão e manutenção de função de células renais, bem como sua capacidade de sobreviverem *in vivo* após injeção em rins de ratos. Estudo prévio do mesmo grupo demonstrou que células renais humanas são capazes de, em condições especiais, produzirem EPO, hormônio produzido por células renais que estimula a produção de hemácias.(22) Em outro estudo, células renais humanas injetadas em rins de ratos com DRC demonstraram melhorar a função renal.(23) Neste estudo avaliaremos a resposta de células renais ao indoxil sulfato, uma das toxinas encontradas em soro de pacientes portadores de DRC, que comprovadamente causa fibrose renal.

Justificativa

A doença renal crônica tem grande prevalência e está associada a múltiplas comorbidades, aumentando o risco de morte e os custos para o tratamento.(24) Diabetes, hipertensão, obesidade e hiperlipidemia são doenças comuns que podem causar doença renal crônica. A doença evolui de forma insidiosa, tendo diagnóstico tardio, o que só possibilita como tratamento, métodos de substituição renal. Entre eles, o melhor método é o transplante. Entretanto, a falta de órgãos determina uma espera média de oito anos em outra terapia de substituição. Grandes avanços tem sido feitos nos últimos anos com terapias celulares. Em doenças renais ainda existem poucos estudos disponíveis na literatura, porém seus resultados são promissores. No presente estudo, células humanas serão expostas a condições iguais às do rim de pacientes portadores de doença renal para avaliar a evolução da patologia, bem como mecanismos reparadores.

Objetivos

1) **Objetivo Primário:**

   Avaliar a viabilidade de crescimento de células epiteliais renais à partir de tecido renal descartado de doadores falecidos.

2) **Objetivos Secundários**

   Caracterizar fenótipo celular e porcentagem de cada célula epitelial em cultura, comparando-se cultura em condições ideais e cultura com exposição à toxina urêmica.

Método

Preparação das células:

Rins descartados do sistema de transplante do Hospital do Rim e Hipertensão foram utilizados para coleta de células renais humanas. Fragmento renal de cerca de 5 cm^3 retirado dos rins descartados foi colocado em solução de preservação e transportado para laboratório onde foi manipulado.

Os fragmentos renais foram colocados em solução de Krebs suplementada com Penincilina-Streptomicina a 1% e as cápsulas renais removidas com bisturi. Os fragmentos renais foram colocados em placa com a solução de Krebs + Penicilina-Streptomicina 1%, picados e amassados até uma consistência de gel.

Quando a consistência de gel foi obtida, 150 µL de Liberaze Blendzyme 3 (Roche, Indianopolis,IN) foi adicionado e transferido com o tecido renal para tubos cônicos, que foram incubados em incubadora *shaker* por 40 minutos. Este conteúdo foi filtrado em peneiras de 100 µm (BD Falcon, San Jose, CA) e centrifugado por 5 minutos em 1500 rpm. O sobrenadante foi aspirado e descartado. O *pellet* (massa de células) foi re-suspenso e centrifugado por mais duas vezes, semeado em placas de 10 cm e armazenado em incubadora a 37ºC e CO_2 a 5%, como descrito previamente. (21)

O meio de cultura foi constituído de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose* (DEMEM; Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com soro fetal bovino a 10% (FBS; Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) e penicilina-streptomicina a 1% e parte igual de *keratinocyte serum-free medium* (KSFM; Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA)

suplementado com soro fetal bovino a 2.5%, insulina, transferina e selênio (ITS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO); e penicilina- estreptomicina a 1%.

O meio de cultura foi trocado a cada 48h. Quando as células atingiram 80 a 90% de confluência foram coletadas após administração de tripsina a 0.05% (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA).

Os experimentos foram feitos nas passagens 1, 2 e 3, quando já existe comprovação de sua função preservada. (21)

Tratamento:

As células foram incubadas por 24 horas a 37Cº 5% CO_2 na ausência e presença de sultato de indoxil (SC, 255218) em diferentes concentrações: 44,5 mg/L, 23,1mg/L e 0,53mg/L (conforme descrita na última revisão disponível na literatura sobre a dose recomendada para essa toxina em ensaios *in vitro* pelo Eutox).(25) Além disso, as células foram incubadas na presença de albumina (35g/L), porém apenas para concentração de 44,5mg/L.(26) Foi preparado uma solução estoque de sulfato de indoxil 10 vezes concentrada e, a partir dessa solução foi feita outra diluição em placa contendo células para atingir as concentrações desejadas.

Citometria de Fluxo (FACS):

Células epiteliais renais em passagem 3 foram tripsinisadas, transferidas para tubos de citomeitra 12x75mm, lavadas com 2 ml de PBS (Sigma, Cat P3744-1PAK). Centrifugou-se a 2000 rpm por 5 min a 4ºC, o sobrenadante descartado. A Adicionou-

se 1 ml de tampão de fixação/ permeabilização contendo Paraformadeído (BD Pharmigen, Cytofix/Cytoperm cat: 554722- 1x) para cada tubo de amostra. As amostras foram incubadas por 20 minutos a 4-8°C. Centrifugou-se e o sobrenadante foi desprezado. Foi acrescentado 50ul de solução tamponante (pH = 7,4-7,6 PBS 1% soro fetal bovino 0,1% azida sódica 0,1% de saponina). A seguir foram adicionados anticorpos primários para detecção NEP, THP, EPO, FOXA3, OCT4, SMA, na concentração de 1ug/mL, para túbulo proximal - nefrilisina - NEP-(sc-19993), para túbulos distais e ductos coletores - proteína de Tamm-Horsfall- THP- (sc-20631), para fibroblastos produtores de hormônio – eritropoietina-EPO- (sc-1310), alfa actina de músculo liso -SMA , Oct4 e FOXP3 para células progenitoras. Células controles foram incubadas para isotipo controle de camundongo e coelho (sc-2025 e sc-2027, respectivamente). O anticorpo anti-actina de músculo liso foi usado para avaliar mudança de fenótipo.

Após três lavagens com PBS (Sigma, Cat P3744-1PAK), as células foram incubadas com anticorpos secundários (Invitrogen, Z25608 ou Z25302) criado em cabra anti-coelho ou anticorpo secundário para cabra (Invitrogen) por 30 min a 4-8°C ao abrigo da luz. Adicionou-se 2 ml de tampão de lavagem contendo saponina (BD Perm/Wash buffer, cat: 554723) em todos os tubos. Após centrifugação, as amostras foram ressuspenssas em 300 ul de solução tamponante e adquiridas em citômetro de fluxo (FacsCanto I, BD).

Analises estatísticas

Para análise estatística o Software SPSS 20.0 foi utilizado. O teste de Kurtosis foi realizado para determinar normalidade da amostra. Para análise dos grupos o teste de ANOVA e correlação de Pearson foram aplicados. Foi utilizado intervalo de confiança de 95% e p significativo para a hipótese de nulidade de 0,05.

Resultados

Cultura de células:

As células renais foram extraídas por método digestivo de rins descartados do transplante renal do Hospital do Rim e Hipertensão – UNIFESP-EPM. Oito doadores foram oferecidos e dois foram descartados. A idade média dos doares foi 46,25 anos. Todos estavam em uso de drogas vasoativas e 50% deles, em uso de drogas nefrotóxicas (tabela 1).

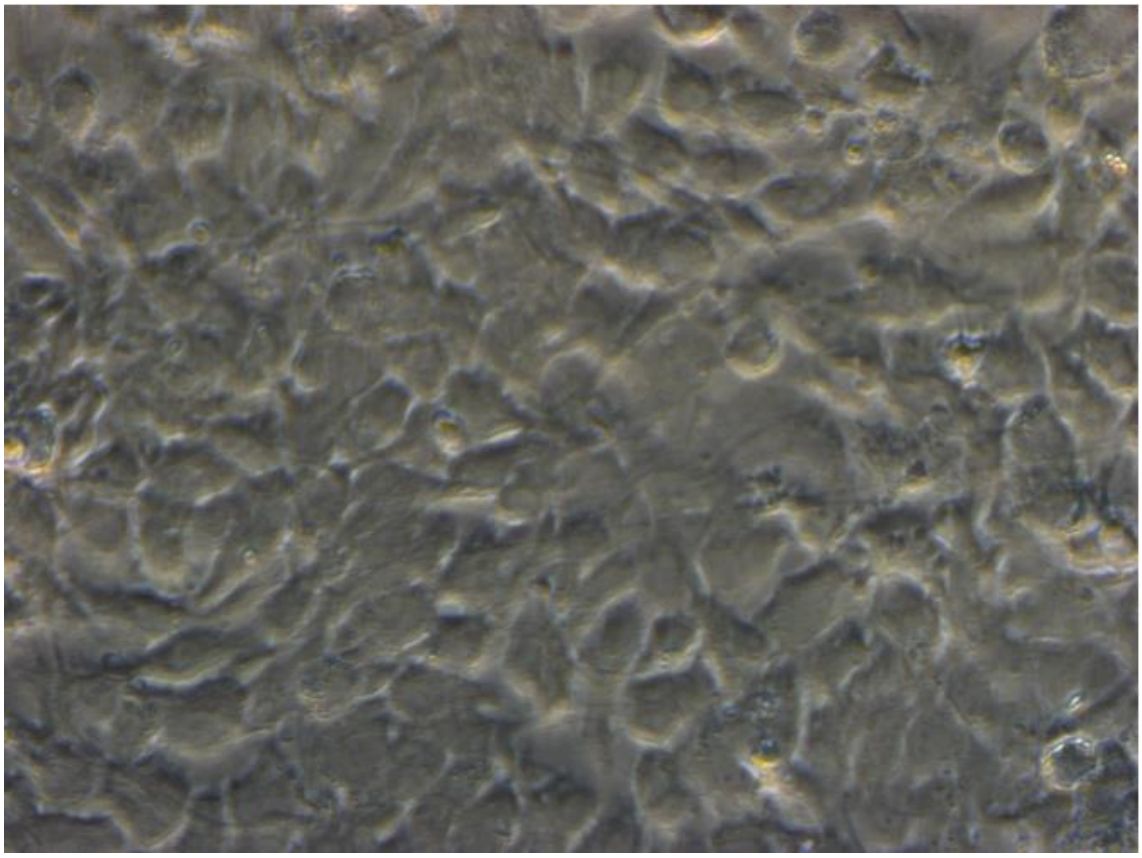
Tabela 1: Características gerais dos seis doadores de células renais.

Idade em anos (média±DP)	46,25± 8,70
Sexo masculino (%)	50
Creatinina de entrada em mg/dl (média±DP)	1,77± 0,46
Creatinina final em mg/dl (média±DP)	4,11±1,13
Pacientes que realizaram biópsia	20%
Peso em Kg (média±DP)	72,2±5,40
Altura em cm (média±DP)	166±5,80
IMC (média)	26,2
Causa de Óbito	AVC 70%
Parada Cardíaca*	100%
Uso de Drogas Vasoativas	100%
Uso de Drogas Nefrotóxicas	50%
Pacientes com Diurese	80%
Dias de internação em UTI (média±DP)	70,9±30,1

* Parada cardíaca (PCR) – refere-se a ocorrência de PCR em qualquer momento da internação.

O tempo de crescimento inicial da cultura foi prolongado cerca de sete dias até atingir confluência de 90%. (Figura 1). O tempo de duplicação celular após passagem 1 foi de 72h.

Figura 1: Imagem de microscopia óptica em aumento de 40x demonstrando confluência das células

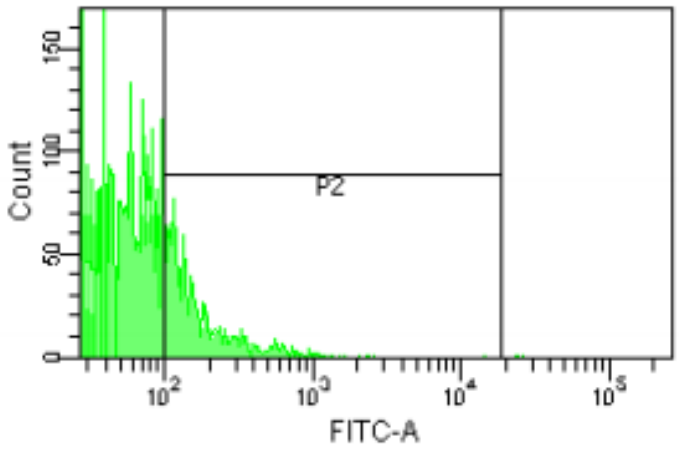


Caracterização das Células:

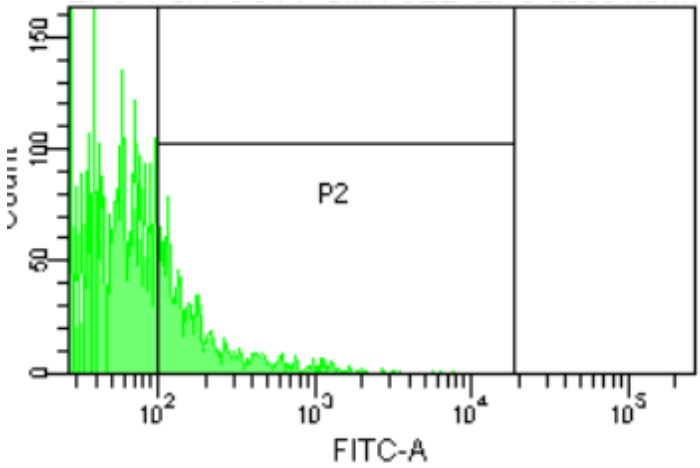
As células foram caracterizadas com uso de anticorpos específicos para diferentes tipos celulares da cultura primária. Foram observados: 4,6% de fibroblastos produtores de eritropoietina (células EPO positivas), 5,4% de outros fibroblastos, células mesenquimais 3,6% (células alpha SMA positivas), 3,9% de células de túbulo proximal (células NEP positivas), células de túbulo distal 2,6% (células THP positivas). Observou-se 8,2% de células progenitoras multipotentes Oct4 positivas. (Figura 2)

Figura 2: Caracterização celular por citometria de fluxo

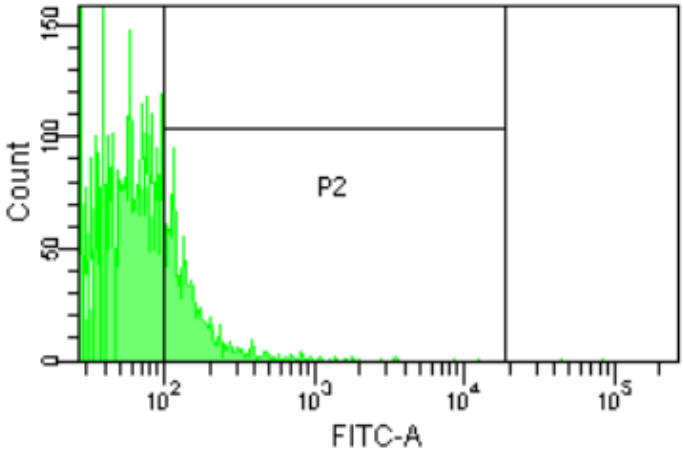
Fibroblastos produtores de EPO – controle



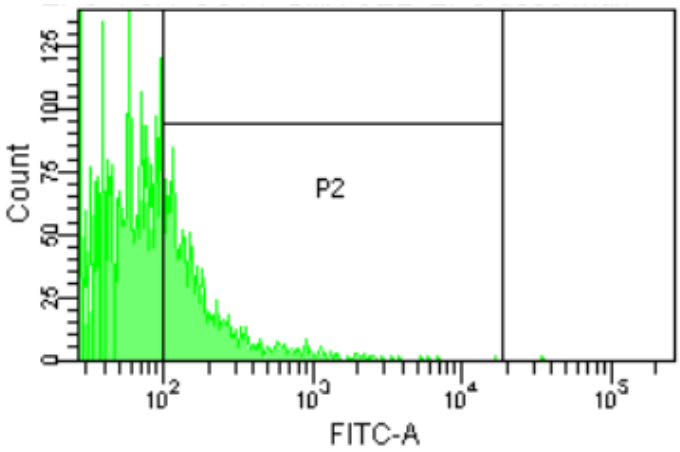
Fibroblastos produtores de EPO após tratamento com dose mínima de indoxil sulfato



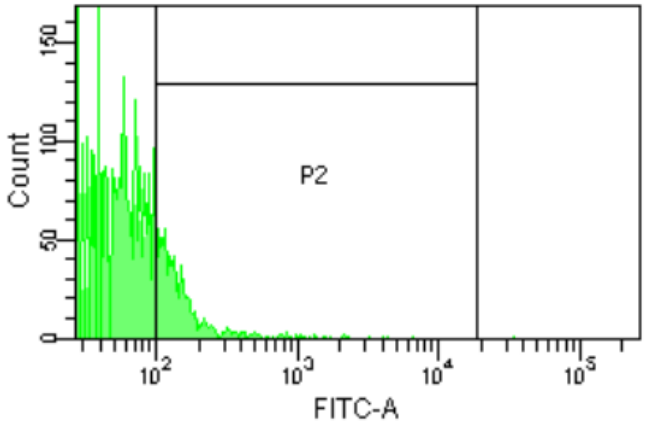
Fibroblastos produtores de EPO após tratamento com dose média de indoxil sulfato



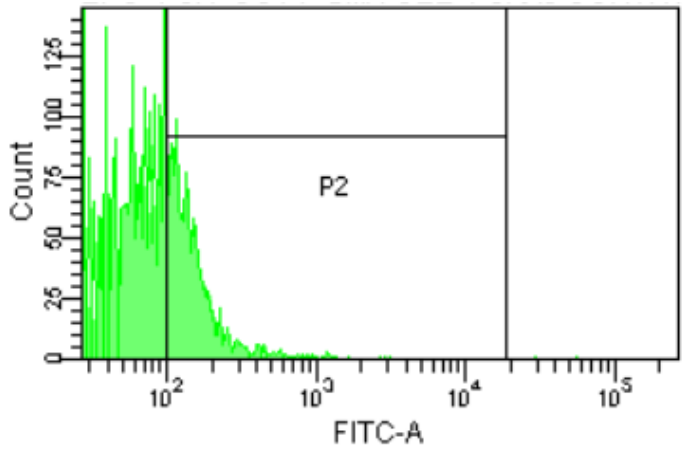
Fibroblastos produtores de EPO após tratamento com dose máxima de indoxil sulfato



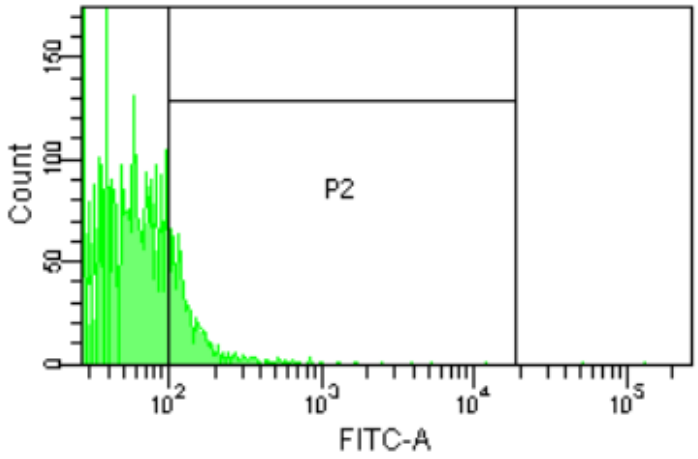
Fibroblastos produtores de EPO após tratamento com dose máxima de indoxil sulfato e albumina



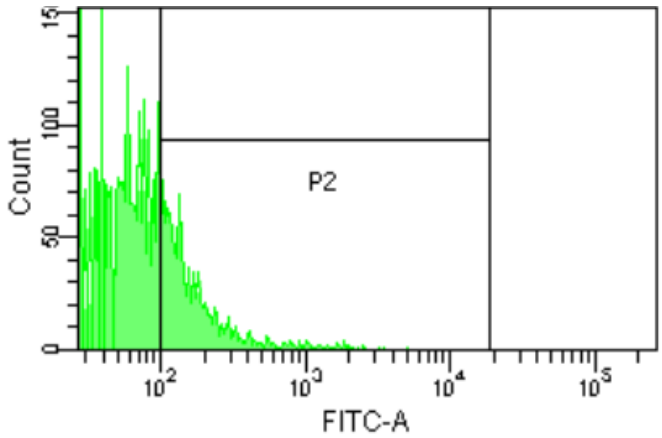
Células progenitoras multipotentes FoxA3 controle



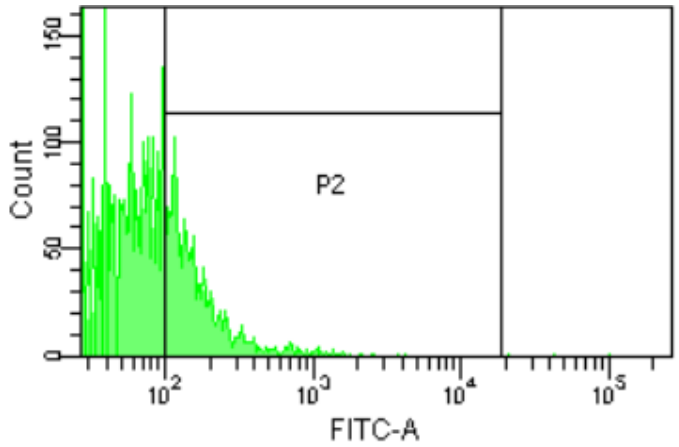
Células progenitoras multipotentes FoxA3 após tratamento com dose mínima de indoxil sulfato



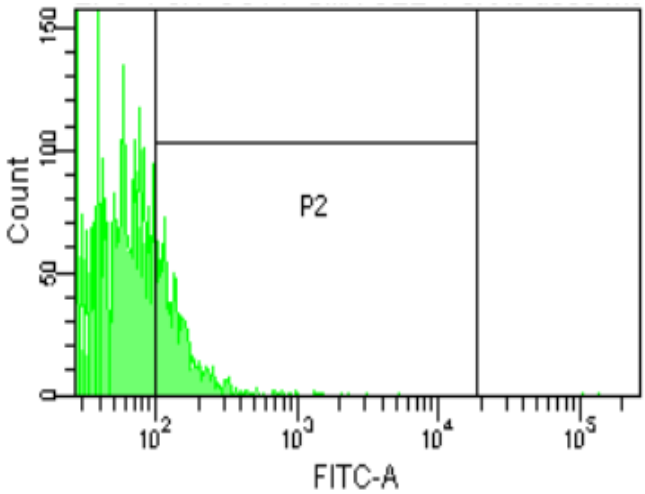
Células progenitoras multipotentes FoxA3 após tratamento com dose média de indoxil sulfato



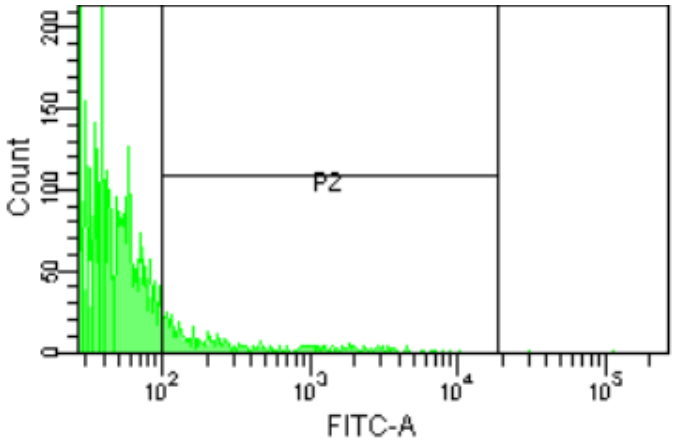
Células progenitoras multipotentes FoxA3 após tratamento com dose máxima de indoxil sulfato



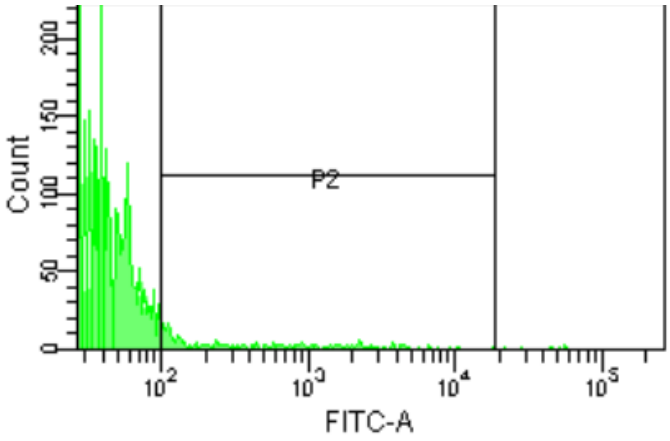
Células progenitoras multipotentes FoxA3 após tratamento com dose máxima de indoxil sulfato e albumina



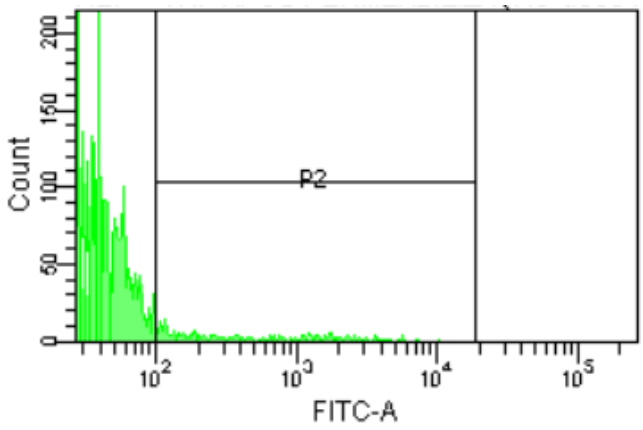
Túbulo proximal - Nep controle



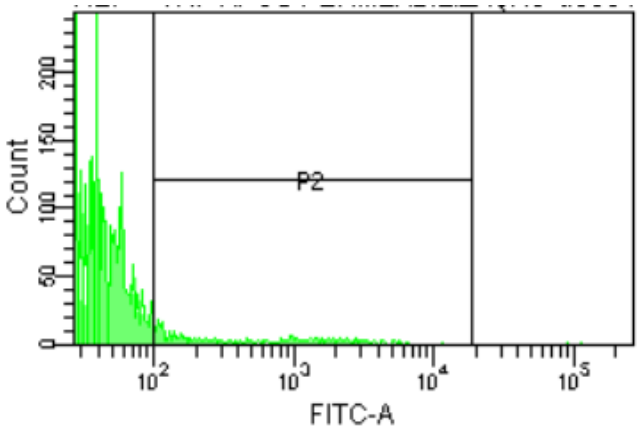
Túbulo proximal -Nep após tratamento com dose mínima de indoxil sulfato



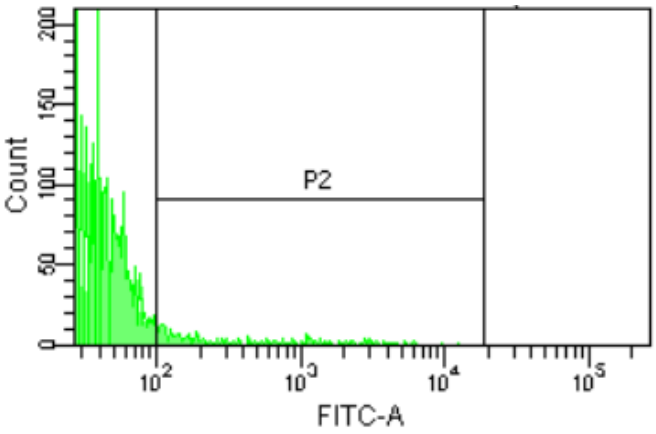
Túbulo proximal -Nep após tratamento com dose média de indoxil sulfato



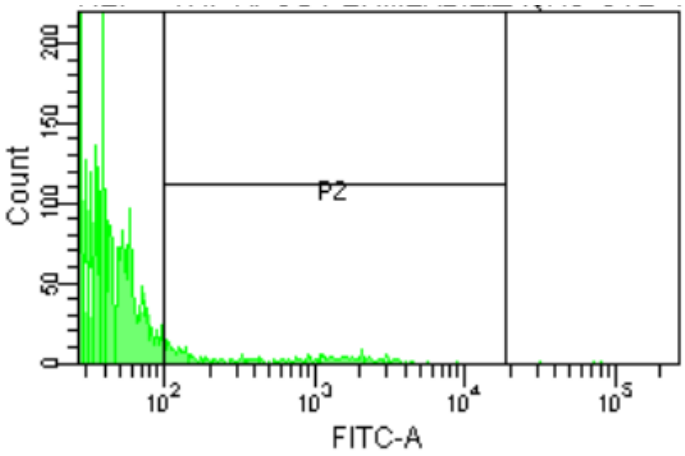
Túbulo proximal -Nep após tratamento com dose máxima de indoxil sulfato



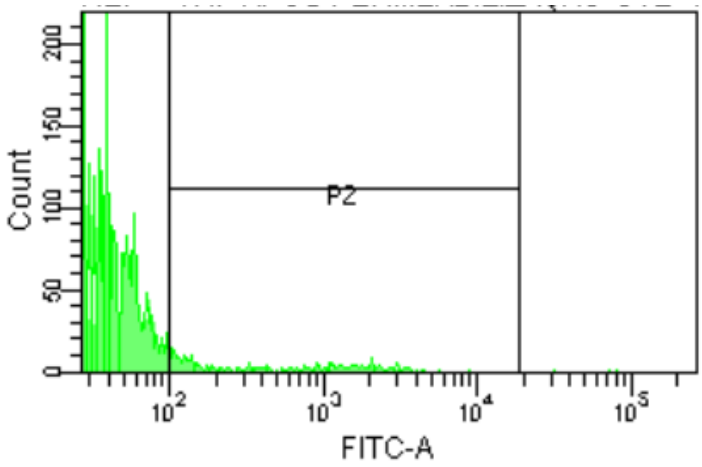
Túbulo proximal -Nep após tratamento com dose máxima de indoxil sulfato e albumina



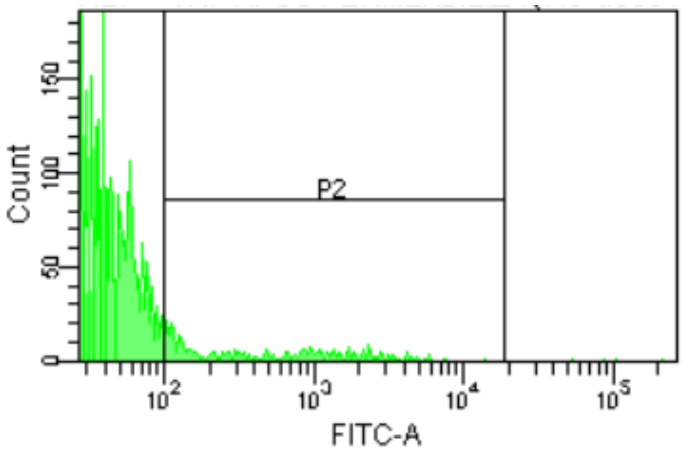
Células de túbulo distal -THP controle



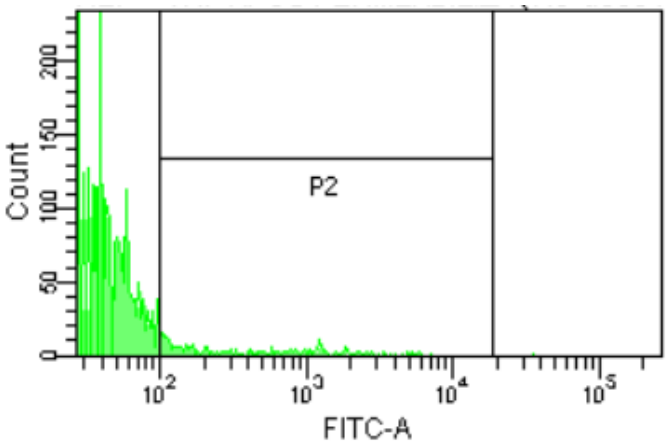
Células de túbulo distal –THP após tratamento com dose mínima de indoxil sulfato



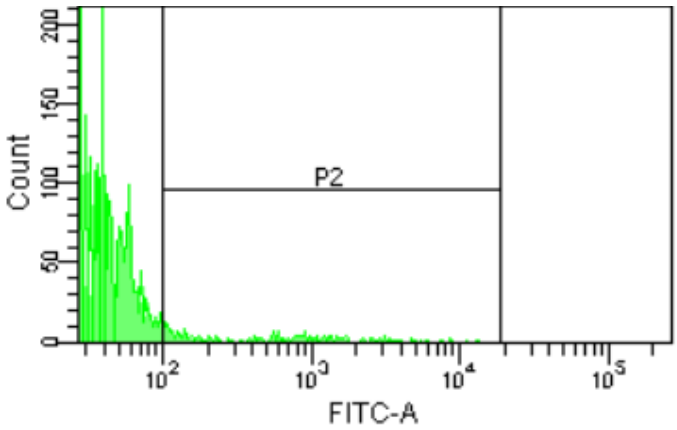
Células de túbulo distal –THP após tratamento com dose média de indoxil sulfato



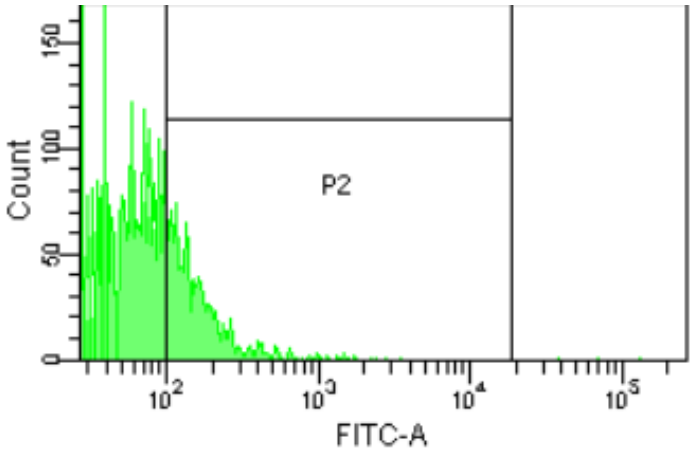
Células de túbulo distal –THP após tratamento com dose máxima de indoxil sulfato



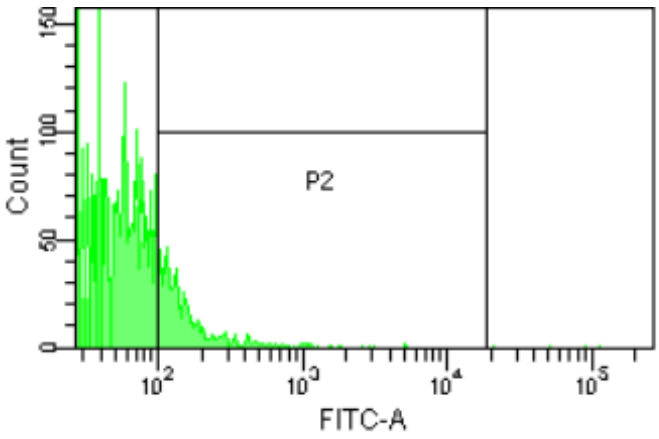
Células de túbulo distal –THP após tratamento com dose máxima de indoxil sulfato e albumina



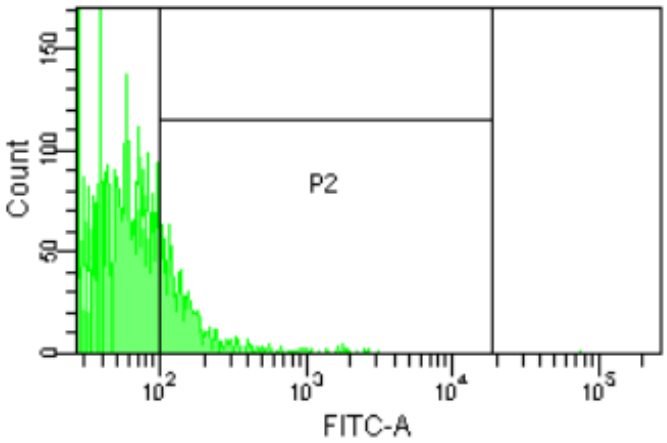
Células mesenquimais – alfa-SMA controle



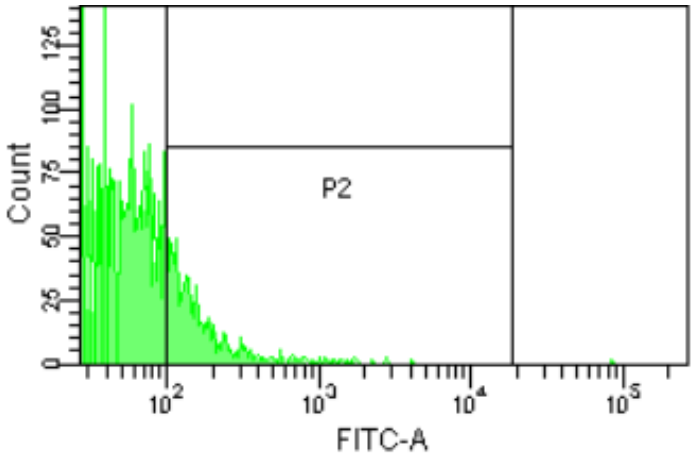
Células mesenquimais – alfa-SMA após tratamento com dose mínima de indoxil sulfato



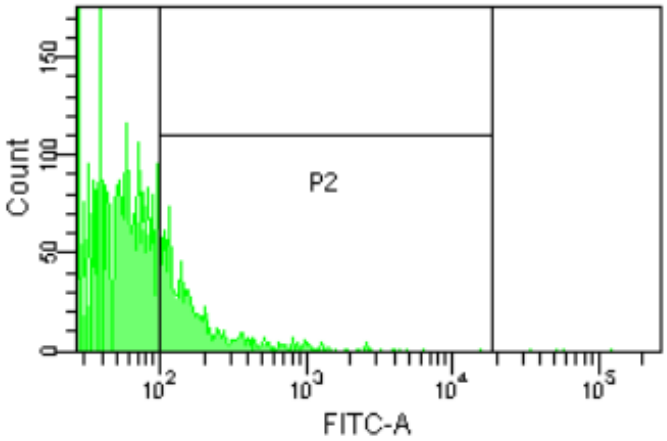
Células mesenquimais – alfa-SMA após tratamento com dose média de indoxil sulfato



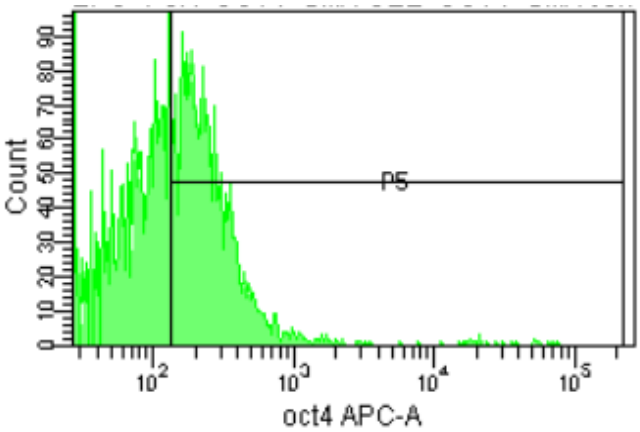
Células mesenquimais – alfa-SMA após tratamento com dose máxima de indoxil sulfato



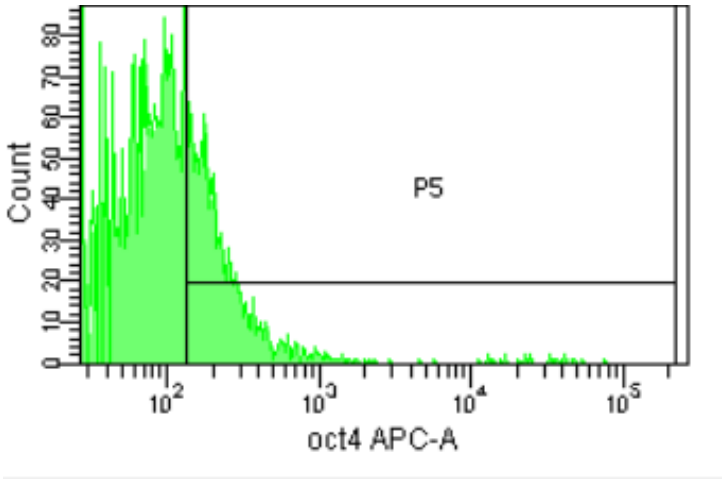
Células mesenquimais – alfa-SMA após tratamento com dose máxima de indoxil sulfato e albumina



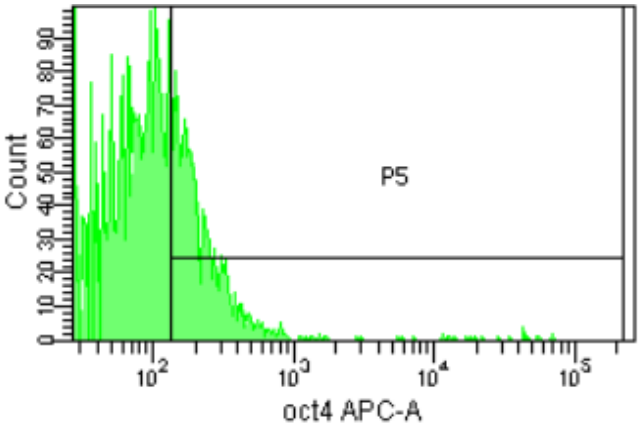
Células progenitoras multipotentes OCT4 - controle



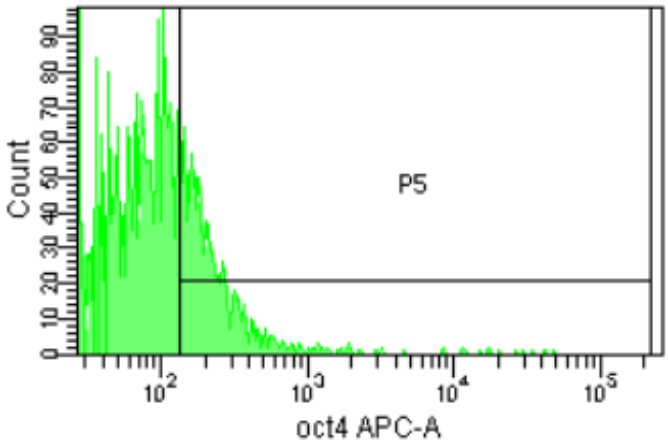
Células progenitoras multipotentes OCT4 após tratamento com dose mínima de indoxil sulfato



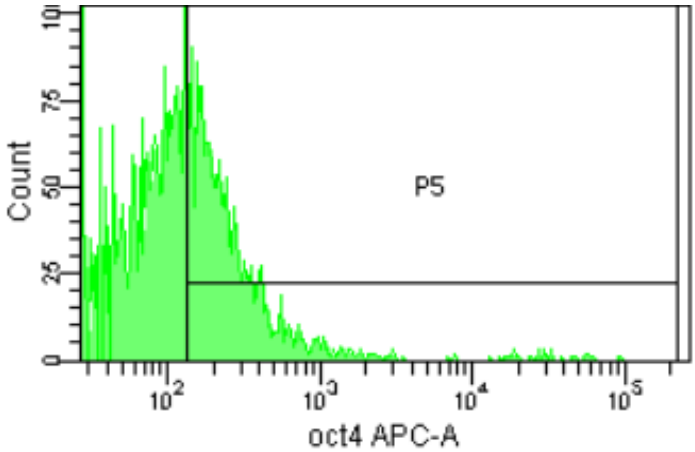
Células progenitoras multipotentes OCT4 após tratamento com dose média de indoxil sulfato



Células progenitoras multipotentes OCT4 após tratamento com dose máxima de indoxil sulfato



Células progenitoras multipotentes OCT4 após tratamento com dose máxima de indoxil sulfato e albumina



Tratamento

Células de cultura primária foram tratadas com três concentrações de indoxil sulfato. As concentrações seguiram as recomendações do EuTox.(25, 26) Sendo: Dose mínima , média e máxima e a dose máxima conjugada com albumina.(27) Não houve diferença significativa na expressão de nenhuma proteína caracterizadora de células. Ou seja, a exposição a toxina urêmica por 24h não alterou o tipos celulares na cultura. Este fato foi comprovado com o teste de viabilidade realizado em todos os experimentos onde a viabilidade manteve-se constante. (Tabela 2)

Tabela 2: Fenótipo celular da cultura após tratamento com indoxil sulfato

	Controle	**Dose Mínima IS**	**Dose Média IS**	**Dose Máxima IS**	**Dose Máxima IS + Albumina**	**P**
NEP	3,3%	2,5%	2%	2%	1,9%	0,58
THP	1,7%	2,2%	2,1%	1,9%	1,6%	0,74
EPO	4,6%	7,15%	3,7%	5,3%	2,63%	0,96
FOXA3	5,1%	2,8%	4,1%	4,2%	2,4%	0,91
OCT4	8,9%	8,1%	5,9%	8,6%	8,1%	0,96
SMA	3,6%	3,7%	3,1%	3,6%	2,4%	0,90

Avaliamos as correlações entre as diferentes proteínas expressas nestas células houve correlação entre a expressão de EPO e apha-actina (p=0,002; r=0,72), EPO e NEP (p=0,05 r=0,48). Existiu uma tendência de correlação entre Oct4 e THP (p=0,07 r=-0,48.)

Discussão

As células renais extraídas para as culturas desses experimentos foram retiradas de órgãos que sofreram insultos que causam lesão renal aguda (LRA). São fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de LRA: hipotensão e uso de drogas nefrotóxicas. Em nosso estudo, observamos que 100% dos doadores receberam drogas vasoativas, demonstrando a ocorrência de hipotensão e consequente hipoperfusão renal. Cinquenta por cento dos doadores receberam alguma droga nefrotóxica. Estes dados somados aos valores de creatinina iniciais (média 1,77± 0,46) e creatinina final (4,11±1,13) comprovam a ocorrência de LRA nos órgão que deram origem a cultura renal.

Os doadores apresentaram como causa de óbito em 70% dos casos acidente vascular cerebral (AVC) o que sugere a existência de uma vasculopatia. A lesão vascular não é exclusiva de uma parte do endotélio, assim sendo, é possível que os rins doados apresentassem também lesão vascular. A creatinina inicial de 1,77 ± 0,46 corrobora esse fato. A ocorrência de insultos que causam LRA e a presença de doença prévia renal são insultos ao tecido renal e causam morte celular e inflamação tecidual.

O tempo de duplicação celular foi prolongado, 72h, em estudo prévio com a mesma população celular o tempo de duplicação das células foi 48h (21). Este fato pode ser decorrente de provável maior agressão ao tecido dos rins doados neste estudo. As células que se replicaram em cultura e que deram origem a população

celular estuda quando submetidas a ao indoxil sulfato em diferentes concentrações e indoxil sulfato associado a albumina não apresentaram alterações em sua viabilidade. Ou seja, estas células não se tornaram apoptóticas. É provável que um seleção de células mais resistentes tenha ocorrido.

Na caracterização da cultura observamos presença de células de túbulo proximal em proporção semelhante a descrita anteriormente . Células de túbulo distal e fibroblastos cresceram em menor proporção. Interessantemente, demonstramos a presença de células progenitoras nesta cultura primária o que é descrito pela primeira vez neste estudo. Este achado é promissor e muito importante. Estudos prévios na literatura descreveram a presença de células progenitoras multipotentes em cápsula de Bowman (16) e em papila renal.(17) As células progenitoras são residentes do órgão e em decorrência das agressões que causam LRA migram para o local de lesão.(18, 28)

A neprilisina (NEP) é um marcador de células de túbulo proximal. As células de túbulo proximal são células que exercem funções como reabsorção de água, sódio, glicose, aminoácidos e bicarbonato. Esta reabsorção é primordial para a homeostase de água e eletrólitos. Tais células são consumidoras de energia, uma vez que muitos de suas funções dependem de uso de ATP. Assim sendo, estas células em situações de hipoperfusão renal tornam-se apoptóticas e descamam, obstruindo túbulos e impedindo a formação de ultrafiltrado. (4) A porcentagem de células de túbulo proximal encontradas em nossa cultura foi de 3,3% o que foi similar ao descrito na literatura.(21) A porcentagem de células positivas para esta proteína não se alterou com o tratamento com indoxil sulfato.

A proteína de Tamm-Horsfall (THP) é um marcador de túbulo distal. O túbulo distal desempenha papel crucial na homeostase de água, uma vez que responde a

hormônios como o hormônio anti-diurético. Além disso, este túbulo responde também a paratormônio sendo portanto responsável pela absorção de cálcio. (4) Neste estudo, 1,7% das células da cultura eram de células positivas para o marcador demonstrando que o método da cultura permite a sobrevivência das células. O fato da porcentagem de células não ter alterado com a exposição ao indoxil pode ser decorrente da não absorção do indoxil por estas células.(29) Assim sendo, mesmo em condições de maior exposição estas células não teriam seu fenótipo alterado.

A eritropoietina é um hormônio que é secretado por fibroblastos específicos do rim. Estes fibroblastos foram descritos como residentes na medula renal onde a tensão de oxigênio é baixa, e em situações de hipóxia o hormônio é secretado e liberado em corrente sanguínea para executar sua função na medula óssea, estimulando a produção de hemácias.(4) É descrito na literatura que fibroblastos positivos para EPO são capazes de serem isolados, cultivados e, em condições de hipóxia, produzirem o hormônio.(22) Já foi também descrito que a injeção destas células pode levar a melhora da função renal em camundongos.(23) Em nosso estudo observamos 4,6% das células positivas para este marcador, o achado foi menor do que nos estudo anteriores. (21-23) Estas células também não tiveram alteração em sua porcentagem durante estímulo pelo fármaco.

A presença de células mesenquimais também descrita neste estudo, demonstrada pela presença de alpha-SMA, também comprova a modificação do tecido renal. Demonstrando a substituição de células epiteliais funcionais por células mesenquimais.(30) Neste trabalho 3,6% das células encontradas na cultura era positiva para estes marcadores e as células não aumentaram com o uso de indoxil. É provável

que maior tempo de exposição pudesse aumentar a porcentagem destas células, uma vez que estão envolvidas no processo de fibrose túbulo-intersticial.(6)

O achado de células positivas para OCt4 e FOXA3 caracteriza a presença de células progenitoras multipotentes. Elas estavam presentes em porcentagem alta se comparada aos outros tipos celulares. Isto é muito interessante, uma vez que existem na literatura algumas evidências do aumento destas células em lesão renal aguda.(31) Estas células também não apresentaram alterações em resposta ao fármaco.

O tratamento das culturas com indoxil sulfato independente da concentração, não foi capaz de alterar o fenótipo celular. É provável que por se tratar de rim em processo inflamatório prévio o insulto tenha sido menos prolongado do que o necessário para determinar a mudança de fenótipo celular. A presença de células multipotentes progenitoras também pode ter modulado a resposta ao fármaco. Assim sendo, estudos futuros serão necessários para exposição de culturas a tempo mais prolongado ao fármaco. A adição de albumina a dose máxima de indoxil também não alterou o fenótipo celular. Entretanto, existiu uma tendência a proteção das culturas. Este estudo foi dose dependente em cultura primária de células renais, a presença de tipos celulares não específicos do rim, demonstrados como células mesenquimais e progenitoras comprovou que estes tipos celulares não sofrem perda da viabilidade ou mudança de fenótipo com a adição do fármaco.

A execução de culturas primárias com células renais de rins descartados do sistema de transplante renal pode ser viável em nosso país. Embora a oferta de rins seja pequena e os rins descartados do transplante e doados para pesquisa sejam provavelmente de pior qualidade, as culturas duplicam-se mais lentamente, no entanto as células são viáveis.

As células de túbulo proximal que executam funções importantes na homeostase de eletrólitos e água, sobrevivem e se multiplicam em cultura. As células de túbulos distais que são responsivas a hormônios também sobrevivem em cultura, assim como os fibroblastos produtores de eritropoietina. Neste estudo descrevemos a presença de células progenitoras multipotentes que são importantes para um terapia celular, uma vez que estas células podem se diferenciar em qualquer tipo celular. A não resposta ao fármaco só corrobora a hipótese inicial de que tais células tem viabilidade alta e capacidade de manter seus fenótipos mesmo em condições hostis.

Conclusões

O crescimento de células epiteliais renais de túbulo proximal e distal foi possível à partir de culturas primárias com rim descartado de transplante renal. Fibroblastos e fibroblastos produtores de eritropoietina também cresceram em cultura primária, bem como células progenitoras multipotentes. Nenhum fenótipo celular alterou-se com exposição dose dependente de indoxil sulfato.

Referências

1. Ikizler TA. CKD classification: time to move beyond KDOQI. J Am Soc Nephrol. 2009;20(5):929-30.
2. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int. 2005;67(6):2089-100.
3. Incidência e Prevalência DRC [database on the Internet]. 2012. Available from: http://www.sbn.org.br/index.php?acessoRestrito&pg=%2Findex.php%3Fcensos.
4. Zatz R. Fisiopatologia renal: Atheneu; 2002 2012.
5. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. J Clin Invest. 2003;112(12):1776-84.
6. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. J Clin Invest. 2002;110(3):341-50.
7. Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA, Murphy M, O'Neill A J, Fitzpatrick JM, et al. TGF-beta1-induced EMT can occur independently of its proapoptotic effects and is aided by EGF receptor activation. Am J Physiol Renal Physiol. 2006;290(5):F1202-12.
8. Hay ED, Zuk A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. Am J Kidney Dis. 1995;26(4):678-90.
9. Taki K, Nakamura S, Miglinas M, Enomoto A, Niwa T. Accumulation of indoxyl sulfate in OAT1/3-positive tubular cells in kidneys of patients with chronic renal failure. J Ren Nutr. 2006;16(3):199-203. Epub 2006/07/11.
10. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, et al. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. Clin J Am Soc Nephrol. 2009;4(10):1551-8. Epub 2009/08/22.
11. Niwa T, Takeda N, Tatematsu A, Maeda K. Accumulation of indoxyl sulfate, an inhibitor of drug-binding, in uremic serum as demonstrated by internal-surface reversed-phase liquid chromatography. Clin Chem. 1988;34(11):2264-7. Epub 1988/11/01.
12. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. Nat Med. 2003;9(7):964-8.
13. Park SH, Choi MJ, Song IK, Choi SY, Nam JO, Kim CD, et al. Erythropoietin decreases renal fibrosis in mice with ureteral obstruction: role of inhibiting TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. J Am Soc Nephrol. 2007;18(5):1497-507.
14. Niwa T, Ise M. Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. J Lab Clin Med. 1994;124(1):96-104. Epub 1994/07/01.
15. Vanholder R, De Smet R, Waterloos MA, Van Landschoot N, Vogeleere P, Hoste E, et al. Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of p-cresol. Kidney Int. 1995;47(2):510-7. Epub 1995/02/01.
16. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. J Am Soc Nephrol. 2006;17(9):2443-56.
17. 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(6):795-804.
18. Oliver JA, Klinakis A, Cheema FH, Friedlander J, Sampogna RV, Martens TP, et al. Proliferation and migration of label-retaining cells of the kidney papilla. J Am Soc Nephrol. 2009;20(11):2315-27.
19. Chade AR, Zhu X, Lavi R, Krier JD, Pislaru S, Simari RD, et al. Endothelial progenitor cells restore renal function in chronic experimental renovascular disease. Circulation. 2009;119(4):547-57.

20. Magnasco A, Corselli M, Bertelli R, Ibatici A, Peresi M, Gaggero G, et al. Mesenchymal stem cells protective effect in adriamycin model of nephropathy. Cell Transplant. 2008;17(10-11):1157-67.
21. Guimaraes-Souza NK, Yamaleyeva LM, Aboushwareb T, Atala A, Yoo JJ. In vitro reconstitution of human kidney structures for renal cell therapy. Nephrol Dial Transplant. 2012. Epub 2012/01/31.
22. Gyabaah K, Aboushwareb T, Guimaraes Souza N, Yamaleyeva L, Varner A, Wang HJ, et al. Controlled regulation of erythropoietin by primary cultured renal cells for renal failure induced anemia. J Urol. 2012;188(5):2000-6. Epub 2012/09/25.
23. Yamaleyeva LM, Guimaraes-Souza NK, Krane LS, Agcaoili S, Gyabaah K, Atala A, et al. Cell therapy with human renal cell cultures containing erythropoietin-positive cells improves chronic kidney injury. Stem cells translational medicine. 2012;1(5):373-83. Epub 2012/12/01.
24. Menon V, Gul A, Sarnak MJ. Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease. Kidney Int. 2005;68(4):1413-8.
25. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. J Am Soc Nephrol. 2012;23(7):1258-70. Epub 2012/05/26.
26. Vanholder R, Meert N, Schepers E, Glorieux G, Argiles A, Brunet P, et al. Review on uraemic solutes II--variability in reported concentrations: causes and consequences. Nephrol Dial Transplant. 2007;22(11):3115-21. Epub 2007/06/07.
27. Vanholder R, Schepers E, Pletinck A, Neirynck N, Glorieux G. An update on protein-bound uremic retention solutes. J Ren Nutr. 2012;22(1):90-4. Epub 2011/12/28.
28. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, et al. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. Kidney Int. 2007;72(4):430-41.
29. Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. J Mol Med. 2004;82(3):175-81.
30. Bedi S, Vidyasagar A, Djamali A. Epithelial-to-mesenchymal transition and chronic allograft tubulointerstitial fibrosis. Transplant Rev (Orlando). 2008;22(1):1-5.
31. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kren S, Eidman K, Connaire J, et al. Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. J Am Soc Nephrol. 2006;17(11):3028-40.