JULIANA PASSOS ALVES DOS SANTOS

**Terapia celular em gatos portadores de doença renal crônica: avaliação
laboratorial e imagiológica**

São Paulo

2012

JULIANA PASSOS ALVES DOS SANTOS

**Terapia celular em gatos portadores de doença renal crônica: avaliação
laboratorial e imagiológica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

Co-orientadora:

Dra. Graciela Conceição Pignatari

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2708
FMVZ

Santos, Juliana Passos Alves dos
Terapia celular em gatos portadores de doença renal crônica: avaliação laboratorial e
imagiológica / Juliana Passos Alves Dos Santos. -- 2012.
102 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

Co-orientador: Dra. Graciela Conceição Pignatari.

1. Doença renal crônica. 2. Gatos. 3. Células-tronco. 4. Tecido adiposo. 5. Ultrassonografia.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Terapia celular em gatos portadores de doença renal crônica: avaliação laboratorial e imagiológica", protocolado sob o nº 1653/2009, utilizando 15 (quinze) gatos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01/07/2009.

We certify that the Research "Stem cells therapy in cats with chronic kidney disease: a laboratorial and image evaluation", protocol number 1653/2009, utilizing 15 (fifteen) cats, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 07/01/2009.

São Paulo, 04 de março de 2011

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, JULIANA PASSOS ALVES

Título: Terapia celular em gatos portadores de doença renal crônica: avaliação laboratorial e imagiológica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

À Deus, meus pais e meu marido

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Maria Angélica Miglino, pela oportunidade e por ensinar que sempre podemos fazer melhor o nosso trabalho, basta termos determinação e confiança.

À Dr^a Graciela Conceição Pignatari por estar sempre disposta a ajudar, tirar dúvidas e acompanhar de perto a evolução do trabalho.

À Prof^a Dr^a Marileda Bonafim Carvalho, pelas sugestões realizadas na qualificação, que enriqueceram o trabalho.

À Prof^a Dr^a Patrícia Cristina B.B. Braga por estar sempre disposta a tirar dúvidas e discutir experimentos.

Aos colegas da pós-graduação que me ajudaram no meu caminho, especialmente Greyson, Márcio, Isabella, Fabiele, Dilayla, Érika, Janaína, Paula, Alvaro, Leandro, Valdir, Marina, Daniela, Luciana e Renatas. Cada um ajudou da forma que pôde, seja em coleta, indicando proprietários, emprestando caixa de transporte, auxiliando em experimentos etc.

À equipe do Hipopet, principalmente Viviane e Gustavo Sato, que me ajudaram com as coletas de tecido adiposo e indicação de proprietários de gatos.

Ao meu amigo Leandro Fadel, por sempre estar disposto a sanar minhas dúvidas e ajudar no que for possível.

A Lisley por ter me ensinado a processar e a cultivar células-tronco do tecido adiposo.

À Fernanda, André, Sarmento, Dayane, Carol, Silvia, Marcão, Thaís, Vitória, etc., pela convivência agradável e divertida.

A Fernanda Cordeiro, Gabriela Rodrigues e Patricia Cuyumjian por disponibilizarem o aparelho de ultrassom nos momentos necessários e também pela ajuda no transporte de material.

À Dr^a Ana Claudia O. Carreira, pela paciência e disponibilidade de ajudar na realização do RT-PCR.

À todos os proprietários que se dispuseram a participar, tanto do processo de triagem como do projeto em si.

A todos os funcionários da Anatomia, principalmente ao Augusto, sempre disposto a me ajudar no que for necessário, ao Maicon e a Rose pela compreensão da necessidade de algumas urgências burocráticas.

Ao meu marido, sempre compreensivo e companheiro de minha jornada, também auxiliando em minhas coletas e nas análises dos dados. Muito obrigada por tudo, principalmente pelo seu carinho e pela paciência invejável!!!!

A minha família que sempre me deu apoio.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Você tem capacidade. Há momentos em que tudo parece conspirar contra você. Desponta até a descrença no seu potencial de ação. Mas, ante as resistências que surgem, empregue a energia adequada, a compreensão e a paciência. Conscientize-se de que não lhe faltam capacidade, inteligência e discernimento. Creia no poder de sua ação. As dificuldades cedem lugar ante a sua postura corajosa e correta. Deus é a sustentação de sua capacidade de ação.

Extraído de Sementes de Felicidade

RESUMO

SANTOS, J. P. A. **Terapia celular em gatos portadores de doença renal crônica: avaliação laboratorial e imagiológica.** [Stem cell therapy in cats carriers of chronic kidney disease: laboratorial and imaging evaluation] 2012. 102f. Tese (Doutorado em Ciências).- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A doença renal crônica é uma das maiores causas de enfermidade e óbito de gatos geriátricos e carreia o declínio da função renal. A forma crônica é caracterizada por persistir um período prolongado de tempo e de prognóstico reservado. Atualmente, a reposição hídrica, a hemodiálise e o transplante são as opções de terapia. Como a terapia com células-tronco tem sido extensivamente estudada nos últimos anos devido a sua capacidade de melhorar a função de órgão lesionados, inclusive os rins, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do transplante de células-tronco de tecido adiposo de gatos, bem como estudar a contribuição de exames complementares laboratoriais e de imagem na evolução terapêutica dos animais. As células provenientes deste tecido apresentaram morfologia fibroblastóide; aderência ao plástico; diferenciaram em osteócitos, condrócitos e adipócitos e expressaram marcadores de superfície característicos de células-tronco mesenquimais. Além disso, quando injetadas em camundongos imunossuprimidos *nude* não apresentaram formações tumorais. Para triar os animais com a doença renal crônica para este estudo foram realizados exames de sangue, urina e ultrassonografia de 97 animais, destes, sete animais tiveram o perfil escolhido e foram incluídos. Neste estudo os animais foram divididos em 3 grupos: placebo (A); terapia celular (B) e terapia celular associada a reposição hídrica (C). Os resultados demonstram que não houve diferença significativa entre os grupos, mas isso se deve ao tamanho de nossa amostra. Entretanto verificamos que 2 animais apresentaram discreta redução da creatinina sérica. Considerando o perfil das citocinas séricas, constatamos aumento significativo da IL6 dentro do grupo A; a IL10 se comportou de maneira diferente entre os grupos, havendo um discreto aumento no grupo B e significativa redução do grupo A e a TNF α não alterou ao longo do tempo. Sendo assim, a inoculação endovenosa de células-tronco do tecido adiposo pode prevenir a progressão da doença de forma sutil.

Palavras-chave: Doença renal crônica. Gatos. Células-tronco. Tecido adiposo. Ultrassonografia.

ABSTRACT

SANTOS, J. P. A. **Stem cell therapy in cats carriers of chronic kidney disease: laboratorial and imaging evaluation** [Terapia celular em gatos portadores de doença renal crônica: avaliação laboratorial e imagiológica]. 2012. 102f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Chronic kidney disease (CKD) is one of the most common causes of illness and death in geriatric cats and leads to a loss of kidney function. The chronic form is characterized by persisting an extended period of time and it has a poor prognosis. Currently, fluid replacement, hemodialysis and kidney transplantation are the treatment options. As the stem cell therapy has been extensively studied in recent years due to its ability to improve the function of organ injured, including the kidneys, this study aimed to evaluate the effect of transplantation of stem cell derived from adipose tissue of cats as also study the contribution of laboratory exams and imaging in therapeutic evolution. Cells from adipose tissue showed fibroblastoid morphology, adherence to plastic; differentiated into osteocytes, adipocytes and chondrocytes and expressed surface markers characteristic of mesenchymal stem cells. Furthermore, when injected into immunocompromised nude mice showed no tumor formation. To screen animals with chronic kidney disease for this study were performed blood tests, ultrasound and urine of 97 animals, these seven animals had chosen profile and were included. In this study the animals were divided into three groups: placebo (A); cell therapy (B) and cell therapy associated with hydration (C). The results show that no significant difference between the groups, but this is due to our sample size. However two cats with CKD of group B experienced modest decrease in serum creatinine. Regarding serum cytokine expression profile, we found a significant increase of IL-6 in the group A; the IL10 behaved differently among the groups, with a slight increase in group B while group A presented significant reduction and TNF α and did not change over time. Thus, the intravenous injection of stem cells from adipose tissue may prevent the progression of disease in a subtle way.

Keywords: Chronic kidney disease. Cats. Stem cells. Adipose tissue. Ultrasound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Esquema ilustrativo do rim e néfron felino.	19
Figura 2 – Fotografia das etapas do processamento do tecido adiposo para obtenção das células-tronco.	34
Figura 3 – Fotografia do procedimento de injeção intramuscular de células-tronco de tecido adiposo proveniente de gatas no membro pélvico esquerdo do camundongo imunossuprimidos nude.	41
Figura 4 – Fotomicrografia das células-tronco de tecido adiposo de gatas após 7 dias de coleta apresentando formato e fibroblastóide	49
Figura 5 – Fotomicrografia das células-tronco de tecido adiposo de gatas em estágio de confluência	51
Figura 6 – Análise da proliferação celular das células de gordura pelo método colorimétrico de MTT	51
Figura 7 – Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo das células-tronco derivadas do tecido adiposo de gatas na forma de histogramas	52
Figura 8 – Análise da expressão dos marcadores de superfície de células-tronco derivadas do tecido adiposo de gatas pela citometria de fluxo	53
Figura 9 – Imagem macroscópica dos órgãos do camundongo imunossuprimido nude injetados com células-tronco do tecido adiposo de gatas após eutanásia	54
Figura 10– Fotomicrografia dos órgãos após coloração com HE	55
Figura 11– Fotomicrografia diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de gatas, coradas com Oil Red	56
Figura 12 – Fotomicrografia das células após diferenciação das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo em linhagem osteogênica, coradas com vermelho de alizarina	57
Figura 13 – - Fotomicrografia diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de gatas, coradas com Tricomio de Masson	57
Figura 14 – Comparação dos valores de creatinina sérica versus densidade urinária entre animais que apresentaram alteração renal pelo exame ultrassonográfico.	59
Figura 15 - Comparação creatinina sérica versus densidade da urina nos diferentes sexos.	59
Figura 16 – Ultrassonografia renal dos gatos do grupo tratamento	63
Figura 17 – Mudanças dos valores de creatinina sérica e hematócrito de todos os grupos ao longo do tempo	71
Figura 18 – Mudanças dos valores de densidade urinária e razão proteína/creatinina urinária.	72
Figura 19 – Correlação entre creatinina sérica e razão proteína/creatinina urinária	73

entre os diferentes grupos

Figura 20 - Análise da Expressão Relativa de cada transcrito dos Animais 1 e 2. 74

Figura 21 - Análise da Expressão Relativa de cada transcrito do Animal 3. 75

Figura 22 - Análise da Expressão Relativa de cada transcrito dos Animais 4 e 5. 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA	do inglês <i>smooth muscle actin</i> , no português actina do músculo liso
°C	grau Celsius
CCZ-SP	Centro de Controle de Zoonoses da Cidade de São Paulo
CD	do inglês <i>cluster of differentiation</i> , no português cluster de diferenciação
CTA	células-tronco adultas
CTM	células-tronco mesenquimais
CTTA	células-tronco do tecido adiposo
cm	centímetro
CO ²	dióxido de carbono
DAPI	40,6-diamidino-2- phenylindol
DI	decilitro
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRC	Doença Renal Crônica
ELISA	do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EPO	eritropoetina
FITC	do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i> e no português isotiocianato de fluoresceína
FIV	vírus da imunodeficiência felina
FELV	vírus da leucemia felina
FGF	do inglês, <i>fibroblast growth factor</i> , no português fator de crescimento de fibroblasto
HE	Hematoxilina-eosina
IgG	imunoglobulina da classe G
IP	índice de pulsatilidade
IR	índice de resistividade
IRIS	<i>International Renal Interest Society</i>
M	molar
Mhz	mega-hertz
mg	miligrama
mL	mililitro

MTT	<i>3-[(4,5- dimethylthiazol-2-yl)- 2,5- diphenyltetrazolium bromide]</i>
Nanog	do inglês, <i>nanog homeobox</i> , em referência à <i>Tir Nan Og</i>
PCR	reação da polimerase em cadeia
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ou tampão salina-fostato
pH	potencial hidrogeniônico
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF- β transformante beta	do inglês <i>transforming growth factor beta</i> e no português fator de crescimento transformante beta
TNF- α	do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i> e no português fator de necrose tumoral alfa
μ l	microlitros
%	por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA RENAL DOS FELINOS	18
3.3 TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO NA DOENÇA RENAL	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 ANIMAIS	32
4.2 MATERIAIS DESCARTÁVEIS.....	32
4.3 COLETA DE TECIDO ADIPOSEO	32
4.4 TESTES DIAGNÓSTICOS PARA FIV/FELV.....	33
4.5 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DO TECIDO ADIPOSEO DE GATAS	33
4.6 ANÁLISE DE CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO DE GATAS	35
4.7 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	36
4.7.1 Ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT	36
4.8 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS DE TECIDO ADIPOSEO DE GATAS.....	37
4.8.1 Análise de Marcadores por Citometria de Fluxo.....	37
4.8.2 Diferenciações: adipogênica, osteogênica e condrogênica	38
4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO DAS CÉLULAS PROGENITORAS DE TECIDO ADIPOSEO EM CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS NUDE.....	40
4.10 TERAPIA CELULAR DOS GATOS COM DOENÇA RENAL CRÔNICA UTILIZANDO CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE GATAS	41
4.10.1 Seleção dos animais	41

4.10.2 Protocolo da Terapia	42
4.10.2 Análise da Terapia	43
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
6 RESULTADOS.....	48
6.1 TESTE DIAGNÓSTICO FIV/FELV	48
6.2 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DO TECIDO ADIPOSE DE GATAS	49
6.3 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	50
6.3.1 Ensaio colorimétrico de viabilidade celular por MTT.....	51
6.4 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSE DE GATAS.....	51
6.4.1 Citometria de fluxo.....	52
6.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO DAS CÉLULAS PROGENITORAS DE TECIDO ADIPOSE EM CAMUNDONGO IMUNOSSUPRIMIDOS NUDE	53
6.6 DIFERENCIAÇÕES OSTEOGÊNICA, ADIPOGÊNICA E CONDROGÊNICA.....	55
6.7 TERAPIA CELULAR.....	58
7 DISCUSSÃO	78
8 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXO A.....	94
ANEXO B.....	99

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) pode afetar aproximadamente 31% dos gatos entre 9 e 12 anos de idade (BOYD et al., 2008) e é caracterizada pela diminuição da filtração glomerular, causando aumento da concentração sérica da ureia e creatinina (SIGRIST, 2007). Na espécie felina, a DRC é predominantemente mediada por dano tubulointersticial, particularmente por fibrose intersticial (YABUKI et al., 2011).

Na forma crônica, a lesão no néfron é caracterizada por persistir um período prolongado de tempo, acarretando em uma série de alterações metabólicas (POLZIN et al. 1997).

O método rotineiramente usado para avaliar a função renal é a mensuração da concentração plasmática de substâncias normalmente excretadas pelos rins, tais como ureia e creatinina.

Atualmente, as tentativas terapêuticas para doença renal crônica, tanto em humanos quanto em animais, incluem reposição hídrica; hemodiálise; administração de anti-hipertensivos e de eritropoetina (ALEXANDRE et al. 2009).

Uma alternativa para esta doença é o transplante renal, mas apresenta frequentemente complicações pós-operatórias tais como: rejeição, isquemia e processo infeccioso (BERNSTEEN et al., 2000).

O surgimento da terapia celular com células-tronco vem sendo considerada uma técnica promissora no tratamento de diversas afecções, pois vários estudos têm demonstrado uma grande capacidade de melhora na função de órgãos lesionados, inclusive os rins (KIRPATOVSKII et al. 2006; SEMEDO et al., 2009; VILLANUEVA et al., 2011; DONIZETTI-OLIVEIRA et al., 2011).

Dessa forma, este projeto teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico das células-tronco de tecido adiposo de gatas em gatos(as) com doença renal crônica, através de exames laboratoriais e de imagem.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do transplante de células-tronco de tecido adiposo em gatos com doença renal crônica.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Isolar e caracterizar células-tronco provenientes de tecido adiposo de gatas
- Testar o potencial carcinogênico das células cultivadas
- Avaliar os efeitos terapêuticos após injeção das células-tronco do tecido adiposo por meio de exames laboratoriais e de imagem

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA RENAL DOS FELINOS

Os rins dos felinos domésticos são aproximadamente iguais em tamanho e forma, porém raramente simétricos e assumem uma posição dorso-peritoneal. O rim direito situa-se ventralmente aos processos transversos da primeira a quarta vértebras lombares, enquanto que o rim esquerdo está localizado ventralmente aos processos transversos da segunda a quinta vértebras lombares (GETTY, 1975; DYCE, 2010).

O parênquima renal felino é dividido em córtex e medula e apresenta margens distintas. Na medula há uma profunda fissura longitudinal denominada hilo renal, região que permite a entrada e saída de estruturas dos rins (veias, artérias, vasos linfáticos, nervos, ureteres). Superficialmente o rim é revestido por uma túnica fibrosa denominada cápsula fibrosa, que confere uma proteção firme e lisa ao órgão (CROUCH, 1969).

Os rins recebem de 20 a 25 % do débito cardíaco, por meio das artérias renais que são dois grandes troncos que se originam da artéria aorta abdominal. Ao atingir o hilo renal, a artéria renal se divide em ramos, formando as artérias interlobares, que seguem em direção à transição corticomedular, passando então a serem chamadas de artérias arqueadas por se apresentarem em formato de arco. A partir deste ponto, elas seguem em direção ao córtex renal, formando as artérias interlobulares (CROUCH, 1969; HUDSON; HAMILTON, 1993; MCGAVIN; ZACHARY, 2005).

As artérias interlobulares dão origem às arteríolas aferentes e cada arteríola dá origem a uma rede capilar enovelada (glomérulo). Estes se reúnem para formar a arteríola eferente, que após divisões formam a rede de capilares peritubulares. As redes de capilares peritubulares se reúnem para formar as vênulas peritubulares e em seguida, as veias interlobulares, que drenam o sangue para as veias arqueadas, que correm em direção as colunas renais como veias interlobares se unem no seio

renal formando as veias comunicantes, que deixam o rim por meio das veias renais, onde o sangue venoso é levado à circulação sistêmica (CROUCH, 1969).

As unidades funcionais dos rins são conhecidas como néfrons que é constituído por um glomérulo, túbulo proximal, alça do néfron, túbulo distal e ducto coletor (DYCE, 2010), como mostra a figura 1. Os néfrons são sustentados por um interstício de tecido conjuntivo e em felinos estima-se a presença de 190.000 (REECE, 2009).

Figura 1 – Esquema ilustrativo do rim e néfron felino.

Fonte: Adaptado de Text-Atlas of Cat Anatomy, 1969 (São Paulo, 2012)

Legenda: Em corte longitudinal do rim é possível visibilizar o córtex e medula. No hilo renal estão inseridas a artéria renal (a. renal), veia renal (v. renal) e o ureter. O néfron é composto pelo glomérulo; túbulo contornado proximal (TCP); túbulo contornado distal, que estão inseridos no córtex; a porção descendente da alça do néfron (AND) e porção ascendente da alça no néfron (ANA) e túbulo coletor estão inseridos na medula.

Cada néfron tem início em uma expansão invaginada por capilares, o glomérulo, que em conjunto com seu revestimento epitelial forma o corpúsculo renal e a parte restante do néfron é formada por tubos diferenciados (DYCE, 2010). O primeiro tubo é o túbulo contornado proximal, que é localizado no córtex renal. As células deste túbulo possuem micro vilosidades que aumentam a área e superfície tubular e, como consequência há a ampliação a sua capacidade absorção. Este túbulo é permeável à água e nele ocorre a reabsorção de sódio, aminoácidos, fosfato, glicose, bicarbonato e cloro (AKERS; DENBOW, 2008; WATSON, 1998).

O túbulo então forma a alça do néfron, uma longa alça em forma de grampo na medula. No ramo descendente da alça do néfron, a membrana é bastante permeável à água e impermeável aos solutos. Este fenômeno provoca um acúmulo de íons de sódio e de cloro no interstício medular renal, aumentando assim sua concentração e osmolaridade. Essa osmolaridade elevada faz com que uma considerável quantidade de água flua de forma constante do interior para o exterior do ramo descendente da alça do néfron. Já, o ramo ascendente é impermeável à água e permeável aos eletrólitos, principalmente sódio, potássio e cloro. Sendo assim a função da porção ascendente da alça do néfron está relacionada com a reabsorção de sais, diluindo assim o fluído luminal (WATSON, 1998)

O ramo ascendente da alça do néfron se dirige ao córtex e dá origem ao túbulo contornado distal, de localização exclusiva cortical. Quando esse túbulo encosta-se ao corpúsculo renal do mesmo néfron, sua parede se modifica, apresentando células cilíndricas, sendo que nas outras porções são cúbicas. Esse segmento modificado chama-se mácula densa. A mácula densa é sensível ao conteúdo iônico e ao volume de água, produzindo moléculas sinalizadoras que promovem a liberação da enzima renina na circulação. Ela se localiza próximo às células justaglomerular, que estão localizadas na arteríola aferente, formando um conjunto conhecido como aparelho justaglomerular, sendo que as células justaglomerulares são responsáveis pela síntese de fatores parácrinos, como o óxido nítrico, a adenosina, e o trifosfato de adenosina, os quais suprimem a liberação de renina (VERLANDER, 2007).

O último segmento do néfron é constituído pelo túbulo coletor que desempenha um papel de importância nos processos de concentração e diluição da urina. É um segmento em que as células têm a capacidade de reabsorver o sódio e

secretar potássio sobre o controle da aldosterona e da arginina vasopressina (CASSOLA, 2000).

Em resumo, podemos dizer que o rim é um órgão bastante complexo e tem como função: balanço hídroeletrolítico e acidobásico; excreção de produtos do metabolismo e regulação hormonal (MCGAVIN; ZACHARY, 2005). Ele também exerce função endócrina sintetizando hormônios, como por exemplo, a eritropoetina, a 1,25-dihidroxi-vitamina D, renina, prostaglandinas e cininas. Existem também hormônios que agem no rim, tais como a aldosterona, endotelinas, vasopressina, paratormônio e catecolaminas (BOIM et al., 2000).

3.2 A DOENÇA RENAL CRÔNICA

O termo doença renal crônica (DRC) refere-se à presença de lesões morfológicas ou funcionais em um ou ambos os rins, de caráter irreversível e progressivo (DIBARTOLA, 2004).

A DRC é uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade em gatos (KING et al, 2007) e pode afetar aproximadamente 31% dos gatos idosos (ELLIOTT; BARBER, 1998; BOYD et al. 2008). Ela é caracterizada pelo declínio da função renal, diminuindo a filtração glomerular, causando aumento dos níveis séricos da uréia e creatinina (SIGRIST, 2007).

Um estudo realizado por KUWAHARA; OHBA; KITO (2006), comparando gatos com doença renal crônica que sobreviveu ou não após o diagnóstico, demonstrou que gatos com altos níveis de creatinina viveram apenas até 1 mês após o diagnóstico.

A evolução da DRC em gatos é muito variável e os episódios de progressão podem se alternar com longos períodos em que a função renal se mantém estável (ROSS et al., 2006). A descrição histopatológica mais frequente é a nefrite túbulo intersticial e as doenças glomerulares são raras (SYME et al., 2006).

Na DRC, a fibrose renal ocorre como consequência do processo inflamatório, deposição excessiva de matriz extracelular, diferenciação de fibroblastos e de células tubulares renais em miofibroblastos causando retração tecidual. Nestas

situações citocinas inflamatórias são liberadas, sendo que as principais envolvidas no processo são a IL-1, TNF- α e a IL-6 (ADAMSON, 2008).

As citocinas são glicoproteínas potentes que agem mesmo em concentrações reduzidas, através da ligação com receptores específicos presentes nas células-alvo, que podem estar na mesma célula que a secretou (efeito autócrino), numa célula próxima (efeito parácrino) ou em uma célula distante (efeito endócrino) (VIEIRA et al., 2001).

Na doença renal crônica o excesso de citocinas recrutam macrófagos para o rim e o infiltrado de macrófagos no interstício está correlacionado com a disfunção renal, fazendo com que as células ampliem sua resposta através da produção de mais citocinas e, isto induz à fibrose e apoptose. Portanto, a ação de algumas citocinas implica na progressão da DRC (METCALFE, 2007),

As citocinas IL-1 e TNF- α são derivadas principalmente de monócitos e estão envolvidas na indução de infiltrado inflamatório celular e promoção de fibrogênese e, por isso favorecem a progressão da lesão renal por diferentes mecanismos: expressão de antígenos MHC classe II; moléculas de adesão; síntese e secreção de eicosanoides e óxido nítrico (POBER; COTRAN, 1989).

O grupo das endotelinas desempenha um papel importante na progressão da DRC, pois bloqueiam a síntese de óxido nítrico; estimulam a proliferação de fibroblastos no interstício e atraem macrófagos (METCALFE, 2007). Já a interleucina 6 (IL-6) é sintetizada por vários tipos celulares, como linfócitos T e B, monócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais e possuem atividade pós-inflamatória e atuam nas células progenitoras eritropoiéticas, estimulando a apoptose (BRUCHFELD et al., 2009)

A lesão renal pode acometer uma ou mais estruturas renais: vasos, glomérulos, interstício e túbulos e pode ser reconhecida através de microscopia óptica e eletrônica, porém algumas lesões somente são identificadas apenas em níveis bioquímicos e ou moleculares (LEES, 2005).

A doença renal é causada por desordens de etiologia variada, como por exemplo: a glomerulonefrite; pielonefrite; nefrite túbulointersticial; amiloidose; nefrose tóxica; hipo ou aplasia congênita; neoplasia; que induzem alterações

funcionais e estruturais do rim (CAMARGO et al., 2006) e a localização do dano pode ser glomerular, vascular, tubular e intersticial (ARAKAKI, 2003).

O método rotineiramente usado para avaliar a função renal é a mensuração da concentração plasmática de substâncias normalmente excretadas pelos rins como ureia e creatinina. Além disso, para avaliação desses dados, é importante o conhecimento dos fatores não renais que podem afetá-los, assim como a análise concomitante de outros exames, como, por exemplo, os de imagem e a avaliação da densidade urinária (POLZIN et al., 2000).

A densidade urinária é razão entre o volume de urina e volume de água pura. Quando a densidade está abaixo dos valores normais é indicativa de doenças que carregam à poliúria (WATSON, 1998).

Em gatos, quando a urina está concentrada adequadamente a densidade urinária é ≥ 1.035 . Gatos com a densidade urinária neste valor possuem baixa probabilidade de estarem afetados pela doença renal, embora possa haver casos em que a urina esteja concentrada, devido à desidratação, mesmo tendo havido a perda de dois terços néfrons funcionais (WATSON, 1998; CANEY, 2008). Segundo Osborne (1995) alguns gatos com a doença renal possuem a habilidade de produzir urina com densidade urinária entre 1.040 e 1.045.

Em relação à densidade baixa deve-se levar em consideração aos diagnósticos diferenciais: diabetes insípidos, piometra e insuficiência hepática (WATSON, 1998).

Com o objetivo de auxiliar e padronizar o monitoramento da doença, em 2009, a *International Renal Interest Society* (IRIS) instituiu uma classificação em estágios para DRC (Quadro 1):

Quadro 1 - Classificação dos estágios da doença renal crônica (DRC) em cães e gatos, de acordo com a *International Renal Interest Society* (IRIS), 2009. (São Paulo, 2012)

Estágio	Creatinina Plasmática (mg/dl)		Comentários
	Cão	Gato	
-	< 1,4	< 1,6	Risco de DRC.
I	< 1,4	< 1,6	Não Azotêmico. Presença de outras anormalidades renais: incapacidade de concentrar urina; alteração na palpação renal ou em exame de imagem; proteinúria persistente.
II	1,4 – 2,0	1,6 – 2,8	Azotemia renal discreta Manifestações clínicas geralmente leves ou ausentes
III	2,1 – 5,0	2,9 – 5,0	Azotemia renal moderada
IV	>5,0	>5,0	Azotemia renal intensa

. Fonte:(IRIS, 2009)

Como relatado acima, a creatinina sérica é o exame rotineiramente utilizado para avaliar excreção renal. Ela é excretada quase que inteiramente pela filtração glomerular e possui taxa de excreção constante no estado de equilíbrio que variam inversamente com a taxa de filtração glomerular (TFG). Portanto, a determinação da depuração de creatinina fornece uma boa estimativa de TFG, porém, esta medida tem limitações, pois, apresenta baixa sensibilidade para detectar graus leves de perda de função renal (CHEW; DIBARTOLA, 1986).

Quanto ao seu metabolismo, pequena quantidade de creatinina é ingerida através de alimentos e é armazenada nos músculos sob a forma de fosfocreatina. Em seguida, a fosfocreatina sofre uma perda espontânea de ácido fosfórico, resultando em creatinina, que é lançada na circulação constantemente. Dessa forma, os níveis séricos de creatinina dependem da massa muscular e da excreção renal (CHEW; DIBARTOLA, 1986).

No caso da DRC, a creatinina sérica é um bom método para avaliar a progressão da doença e da resposta ao tratamento instituído (BRAUN et al., 2003) porém, seus valores devem ser interpretados de forma cautelosa já, que o aumento pode ser consequente da alimentação, de drogas, de causas pré e pós-renais e

ainda, pode ocorrer também, diminuição devido à perda da massa muscular, pois como vimos anteriormente a fosfocreatina é armazenada nos músculos.

Como a creatinina é considerada um indicador da taxa de filtração glomerular, a concentração urinária de creatinina é proporcional à concentração total de soluto na urina. Logo, quando a taxa de creatinina excretada na urina é comparada com a quantidade de proteína urinária através da razão proteína:creatinina (RPC), sendo que a quantidade de proteína perdida pode ser quantificada, eliminando-se a interferência do volume de urina. Portanto a RPC é uma avaliação mais adequada para mensurar a perda urinária de proteína (proteinúria), mas devemos ter os conhecimentos dos fatores que podem acarretar em resultados falso-positivos (FINCO, 1995).

Como vimos, a IRIS também propõe subestágios da DRC e estes estão relacionados com a proteinúria e hipertensão arterial sistêmica e as classificações do paciente quanto a proteinúria se encontram a, no quadro 2.

No caso de haver proteinúria persistente, trata-se de uma situação patológica (LEES et al., 2005) e pode ser causada por alterações renais ou extrarrenais, sendo que esta última causa está frequentemente associada à inflamação ou hemorragia do trato urinário inferior. De acordo com AMADOR (2009), a proteinúria persistente está associada a uma maior morbidade e mortalidade em todas as espécies.

Quadro 2 – Classificação da proteinúria segundo a IRIS (2009) (São Paulo, 2012)

Valores da razão proteína/creatinina urinária em gatos	Subestágios
< 0,2	Não proteinúrico
0,2 – 0.4	Suspeitos
>0,4	Proteinúrico

Fonte: (IRIS, 2009)

No quadro 3 mostramos resumidamente a classificação dos diferentes tipos de proteinúria, de acordo com a origem (fisiológica/patológica) e a localização, segundo Grauer (2007).

Quadro 3 - Classificação da proteinúria segundo a origem e localização (São Paulo, 2012)

Classificação da Proteinúria	Valores da razão proteína/creatinina	Exemplo de Alterações Clínicas
Fisiológica	<0,5	Febre/ Estresse
Proteinúria patológica não urinária	Variável	Insuficiência cardíaca congestiva/ Hemoglobinúria
Proteinúria urinária extrarrenal	Variável	Inflamação do trato urinário inferior
Proteinúria urinária renal		
Parênquima	Variável	Inflamação em parênquima
Tubular	0,5 – 1,0	Pode estar associada à glicosúria
Glomerular	>1,0	

Fonte: Adaptado de Grauer, 2007

Além disso, na DRC é importante também avaliar a presença de anemia através do hemograma, pois é uma alteração muito comum nessa doença.

A anemia é definida como um estado deficiente de hemácias e hemoglobina, que resulta em redução de fornecimento de oxigênio a todos os órgãos e um declínio subsequente no metabolismo celular (CHALHOUN et al., 2011).

Na DRC a anemia é normocítica, normocrômica e não regenerativa (BROWN, 1998) e é comum em gatos nos estágios III e IV da IRIS. Ela é resultado principalmente da capacidade prejudicada dos rins em produzir uma quantidade suficiente de eritropoetina, porém outras causas podem contribuir, como por exemplo: a hemorragia gastrointestinal e a deficiência de ferro. A uremia também diminui a sobrevivência da série vermelha, contribuindo para a anemia (POLZIN, 2011).

O exame ultrassonográfico é o exame de imagem mais utilizado para avaliar os rins (SEYREK-INTAS; KRAMER, 2008). Neste exame é possível avaliar, de forma dinâmica, a topografia, o contorno, o tamanho e a forma dos rins (NYLAND et al., 1995). Em relação à arquitetura renal é possível avaliar a relação corticomedular e ecogenicidade da cortical, sendo que nos gatos a ecogenicidade desta região pode

estar mais elevada quando comparada com as dos cães, e isso se deve ao acúmulo de gordura no epitélio tubular nesta espécie (OSBORNE; FLETCHER, 1995).

Normalmente o córtex renal apresenta-se hipoecogênico em relação ao baço e a medula se apresenta anecogênica e hipoecogênica. A distinção entre essas regiões se dá por uma linha estreita linha ecogênica (YEAGER; ANDERSON, 1989)

Na progressão da DRC, os rins diminuem de tamanho, podendo ser avaliado pela ultrassonografia. Em casos de normalidade, o comprimento renal dos gatos varia de 3,0 – 4,3 cm (D'ANJOU et al., 2008). Além disso, os rins podem apresentar aumento da ecogenicidade da cortical e perda da distinção corticomedular (NYLAND et al., 1995). Desta maneira, pode-se avaliar progressão da doença conforme visibilização de alterações da arquitetura, da ecotextura e do tamanho renal, observada em exames seriados.

Atualmente, as tentativas terapêuticas para DRC, tanto em humanos quanto em animais, incluem a hemodiálise; reposição hídrica; administração de anti-hipertensivos e de eritropoetina. Entretanto, nenhuma dessas terapias previne a progressão da doença, apenas são formas de aumentar a taxa de sobrevivência do indivíduo (ALEXANDRE et al., 2009).

Em humanos, a DRC pode ser considerada hoje uma epidemia possuindo altas taxas de mortalidade e morbidade, apesar de todos os avanços já obtidos na área e, portanto, são necessárias formas terapêuticas alternativas (SEMEDO et al., 2009). Dessa forma, o surgimento da terapia celular com células-tronco vem sendo considerada uma técnica promissora no tratamento de diversas afecções, e vários estudos têm demonstrado uma grande capacidade de melhora na função de órgão lesionados, inclusive os rins (KIRPATOVSKII et al., 2006).

3.3 TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO NA DOENÇA RENAL

As células-tronco são definidas como células capazes de auto-renovação e de gerar células diferenciadas de um determinado tecido (KOOY et al., 2000, RA et al., 2011).

De acordo com o potencial de diferenciação das células-tronco, essas as células podem ser classificadas em: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e oligopotentes. As totipotentes são as células capazes de se diferenciarem em qualquer tecido embrionário ou de anexos embrionários, isso é, gerar qualquer tipo celular; as pluripotentes são as capazes de se diferenciarem em qualquer tecido embrionário, isso é, são progenitoras de tecidos das três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma); as multipotentes podem diferenciar em alguns tipos celulares dentro de um determinado órgão e com isso, possuem plasticidade limitada e as oligopotentes ou unipotentes podem originar poucos tipos celulares ou apenas um (ZHANG et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais (CTM) foram isoladas inicialmente em 1976, por Friedstein et al, como células da medula óssea com capacidade de formar unidades de colônia semelhantes a fibroblasto *in vitro*. Em 1991, Caplan definiu o termo CTM como sendo uma célula capaz de dar origem a outras linhagens de células diferentes à da sua origem.

Em 2005, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e dos Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) definiu que: as CTM devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em cultura; devem expressar CD105, CD73 e CD90 e não expressar os marcadores CD45; CD34; CD14 ou CD1b, CD79a ou CD19 e HLA-DR e ainda, devem se diferenciar em osteoblasto, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais (CTM) ou células estromais mesenquimais multipotentes (CEMM), como vem sendo atualmente chamadas, são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos (MEIRELLES et al., 2009).

As CTM expressam um grande número de moléculas bioativas como: moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células (BOBIS et al., 2006). Essas moléculas, na maioria das vezes, atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (CAPLAN, 2009).

Além disso, o contato entre as células faz com que também haja a produção, pelas CTM, de diferentes tipos de fatores de crescimento, incluindo fator estimulador de colônias de granulócitos, de macrófagos (GM-CSF) e interleucinas (IL), que influenciam fibroblastos e células granulocíticas envolvidas no processo de inflamação (BOBIS et al., 2006).

As CTM expressam pequenas quantidades de complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC-I) e baixos níveis de MHC-II e/ou não expressão MHC-II em sua superfície exercendo, portanto um fenótipo de imunotolerância (CAPLAN, 2009).

Muitos estudos com CTM derivadas da medula óssea já existem e atualmente, as células-tronco originadas do tecido adiposo (CTTA) estão ganhando notabilidade, por serem células multipotentes, de fácil obtenção e de rápida proliferação quando comparadas com outras fontes (D'ANDREA et al. 2008). Estudos demonstram que as CTTA possuem um potencial para reparar tecidos, efeitos proangiogênicos, secreção de fatores antiapoptóticos e efeitos imunomoduladores (HONG, 2010).

Além disso, a utilização dessas células para terapia celular não possuem questões éticas envolvidas, como as células-tronco embrionárias e fornecem maior quantidade de células-tronco, quando comparada com a medula óssea (MACLEOD et al., 2010).

Em 2001, Ikegame et al. fizeram um estudo comparativo de terapia celular, utilizando dois tipos diferentes de células (CTTA e medula óssea), num modelo de isquemia cerebral. Este estudo constatou que os resultados do tratamento com CTTA foram mais promissores do que os realizados com medula óssea e uma das explicações para este fato é que as CTTA apresentam maior expressão do fator de crescimento vascular endotelial do que as células da medula óssea e assim, participam da reparação tecidual.

Além disso, há uma hipótese de que o tecido adiposo tenha uma grande quantidade de CTM por ser extensivamente vascularizado (LIN et al., 2010).

Especificamente em nefrologia, as CTM têm sido utilizadas em modelos experimentais de lesão renais agudas (LRA), glomerulonefrite e DRC (SEMEDO et al., 2009).

Em 2005, Togel et al. utilizaram células-tronco de medula óssea para tratar ratos com doença renal aguda e demonstraram uma melhora significativa na função

renal após 24 horas do tratamento. Já, em 2007, SEMEDO et al. realizaram terapia celular com células-tronco de medula óssea em ratos com doença renal crônica e acompanharam por 2 meses, onde novamente foi observada uma melhora da função renal, através da redução dos níveis séricos de creatinina e ureia.

Li et al. (2006) administraram células-tronco provenientes de medula óssea, em camundongos com glomeruloesclerose e após 12 semanas foi observado redução da infiltração de macrófagos, reparo e regeneração de células endoteliais e mesangiais.

Sagrinati et al. (2008) testaram o potencial regenerativo das células-tronco de medula óssea em modelos animais da doença renal aguda e crônica, e demonstraram que apesar destas células serem pobres na diferenciação em células renais, elas promoveram melhora da função renal, através da liberação de fatores parácrinos presentes em células lesionadas além de possuírem potencial imunomodulatório. Além disso, essas células demonstram habilidade quimiotática e de migração para áreas de lesão ou inflamação, propriedade conhecido como *homing*, aumentando a perspectiva da aplicação dessas células em diferentes sítios (AGGARWAL; PITENGER, 2005).

Alexandre et al. (2009) injetaram linhagem negativa de células da medula óssea em ratos com glomeruloesclerose induzida e também demonstraram melhora significativa na função renal com diminuição da proteinúria; da glomeruloesclerose; da inflamação e da anemia.

Em 2009, Semedo et al. trataram ratos *Wistar* com DRC induzida com células-tronco de medula óssea e observaram melhora da função renal, diminuição das concentrações séricas de creatinina; da proteinúria e redução das áreas fibróticas. Neste trabalho também foi observada diminuição da glomerulosclerose observada através de estudos histológicos e diminuição da expressão do RNA mensageiro de moléculas fibróticas, principalmente vimentina, colágeno1, TGF- β . Outrossim, as células injetadas foram encontradas no parênquima renal; houve também o aumento da expressão de fator de crescimento de hepatócito, que está correlacionado com as propriedades antifibróticas e diminuição da expressão das citocinas séricas IL-1 α ; IL-1 β ; IL-6; IL-10; IFN γ e TNF- α caracterizando, segundo o autor, uma provável imunossupressão decorrente do tratamento com as CTM .

Donizetti-Oliveira et al. (2011) concluíram que as células-tronco derivadas do tecido adiposo modulam a resposta inflamatória para tratar camundongos com DRC

induzida, pois notaram a redução da expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α e aumento da expressão de citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10.

Em relação aos felinos, Quimby et al (2011), injetaram células-tronco derivadas do tecido adiposo diretamente no parênquima renal de 3 gatos com DRC, em estágios diferentes da doença, II, III e IV respectivamente, de acordo com a IRIS e demonstraram que houve uma discreta diminuição da creatinina sérica em dois destes animais. Neste trabalho, os pesquisadores concluíram que somente uma injeção não é o suficiente para uma melhora significativa da DRC. No entanto, diversas injeções no parênquima renal requerem sucessivas sedações, o que inviabiliza a terapia.

Em 2012, Hyun et al. injetaram células-tronco derivadas do tecido adiposo em camundongos com nefropatia IgA induzida e constataram notável diminuição da proteinúria, apesar de não ter havido a diminuição da deposição de IgA. E, observaram diminuição das citocinas produzidas por T helper 1 (Th1) no rim, concluindo que essas células contribuíram através de efeitos parácrinos.

Atualmente, vários grupos vêm estudando o papel imunomodulador das células-tronco em modelos diversos, porém convém ressaltar que, a terapia celular pode realmente ter papel importante na Medicina Regenerativa. Dessa forma, o objetivo principal deste trabalho foi estudar o potencial terapêutico das células-tronco derivadas do tecido adiposo de gato na DRC felina em diferentes estágios de acordo com IRIS 2009.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a coleta do tecido adiposo foram utilizadas gatas de clínicas veterinárias cadastradas nas campanhas de castração do Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo (CCZ-SP).

Os camundongos imunossuprimidos *nudes* foram provenientes do Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

Para realização do Protocolo de Terapia Celular utilizamos gatos(as) provenientes de proprietários particulares, gatis e organizações não governamentais e só foram submetidos a Terapia após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

4.2 MATERIAIS DESCARTÁVEIS

As placas, tubos, ponteiras com ou sem filtro, pipetas de plástico, tubos cônicos, tubos de micro centrífuga e de congelamento e filtros foram adquiridos da Corning (Corning, NY, EUA) ou Fisherbrand (Pittsburgh, PA, EUA), Nalgene Nunc (Norgeville, IL, EUA), Costar (Corning, NY, EUA) ou Falcon (NJ, EUA).

4.3 COLETA DE TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo subcutâneo foi coletado de gatas submetidas ao procedimento cirúrgico de ovariossalpingohisterectomia em clínicas veterinárias cadastradas nas campanhas de castração do CCZ-SP.

Primeiramente, o tecido foi lavado com PBS transferido para um tubo de polipropileno de 50 mL contendo 20 mL de meio de cultivo DMEM alta glicose (LGC Biotecnologia, SP, Brasil) e 3% de Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen, CA, USA) e, transportado em gelo para o Laboratório de Células-Tronco (LCT) do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP).

4.4 TESTES DIAGNÓSTICOS PARA FIV/FELV

Como retrovírus da imunodeficiência felina (FIV) e leucemia felina (FELV) podem estar presentes em gatos saudáveis incluímos neste estudo, a coleta de amostras de sangue das gatas submetidas à coleta de tecido adiposo. Portanto, teste de ELISA através de kits SNAP Comb® FELV/FIV da IDEXX (IDEXX, Maine, USA) para detecção da proteína p27 do FELV e anticorpos anti-FIV foram realizados em laboratório privado.

Desta forma, o sangue após coletado foi centrifugado durante 30 minutos a 1520 *g* e, então o soro foi transferido a um tubo de micro centrifuga, armazenado no freezer e com prazo de até sete dias, encaminhado ao laboratório privado.

4.5 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DO TECIDO ADIPOSEO DE GATAS

As células-tronco derivadas do tecido adiposo foram isoladas através da digestão enzimática do tecido com Colagenase tipo I (Invitrogen). Para tanto, o tecido foi lavado com PBS, macerado com auxílio de um bisturi e, posteriormente a enzima Colagenase tipo I (1mg/mL) foi adicionada até cobrir o tecido e incubada em estufa a 37⁰ durante 30 minutos.

Após digestão, a enzima foi inativada através da adição de meio de cultivo contendo SFB (Invitrogen) e o material processado foi colocado em tubo de polipropileno de 15 mL e centrifugado a 90 g durante 5 minutos.

Neste momento, três métodos diferentes de cultivo foram realizados:

- 1) Adição do sobrenadante diretamente na placa de 35 mm com meio de cultivo (DMEM alta glicose contendo 10% soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina;
- 2) Adição do precipitado na placa de 35 mm com meio cultivo de cultivo;
- 3) O sobrenadante foi submetido a um filtro de aço inox com porosidade de 150 μ m e posteriormente, as células obtidas após a passagem foram semeadas em placas de 35mm contendo o meio de cultivo (Figura 2).

Figura 2 – Fotografia das etapas do processamento do tecido adiposo para obtenção das células-tronco.

Fonte: SANTOS, JPA, 2012

Legenda: A) Fotografia da transferência do tecido adiposo de gatas coletado e transportado no tubo cônico de 50 ml para placas para a realização da lavagem com PBS e, posterior digestão enzimática com Colagenase I. B) Visualização do tecido adiposo e homogeneizado de células após digestão com Colagenase I e centrifugação (seta preta). C) Placas contendo o tecido adiposo processado em meio de cultivo, prontas para serem mantidas em incubadora de CO₂ que mantém uma atmosfera úmida e 37°C.

As placas contendo os três diferentes métodos de obtenção das células adiposas de gatas foram mantidas em uma incubadora de CO₂ a 37° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Os primeiros repiques iniciaram-se quando as células atingiam confluência de aproximadamente 80%. Para tanto, primeiramente o meio de cultivo existente na placa foi retirado e, posteriormente as células foram lavadas com PBS por duas vezes para a retirada de todo o resíduo de soro fetal bovino existente, presente no meio de cultivo. Em seguida, 1 mL da enzima *Tryple* (Invitrogen) foi adicionado e as placas foram incubadas por 4 a 5 minutos a 37°C.

Após este período, o descolamento celular foi monitorado a partir da observação constante no microscópio de luz (Nikon Eclipse TS 100, Tóquio, Japão) e tendo ocorrido, 5 mL de meio de cultivo suplementado com SFB foram adicionados, para a inativação da enzima. Após esse procedimento, toda suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 mL e centrifugados a 90 g durante 5 minutos.

Em seguida, o precipitado celular foi suspenso em meio de cultura, para a contagem celular em câmara de Neubauer, sendo posteriormente transferidas para placas ou garrafas de cultivo, conforme o número de células.

As células foram mantidas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e o meio de cultivo foi substituído a cada 2 ou 3 dias de acordo com o consumo.

4.6 ANÁLISE DE CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO DE GATAS

Conforme as células se expandiam outro procedimento muito importante realizado foi a criopreservação e assim, alíquotas de células foram congeladas em meio de congelamento contendo 50% de DMEM alta glicose, 40% de SFB e 10% de DMSO (LGC Biotecnologia).

Para tanto, placas com confluência aproximada de 80% foram submetidas ao processo de tripsinização conforme descrito acima. Após contagem em câmara de Neubauer, aproximadamente um milhão de células foram suspensos em um 1 mL de meio de congelamento gelado e transferidos a criotubos. Imediatamente após a

transferência, os criotubos contendo as células foram colocados no aparelho *Mister Froozen* que permite que a temperatura abaixe lentamente em freezer -80°C . Após 24 horas, os criotubos foram acondicionados em galões contendo nitrogênio líquido, onde permanecem armazenados.

Quando necessário, as células foram submetidas ao descongelamento rápido no banho-maria a 37°C . Depois de descongelada, a suspensão celular contida nos criotubos foi transferida rapidamente para tubos de polipropileno de 15 mL contendo meio de cultivo para inativar a ação tóxica do DMSO. Após centrifugação a 90 g por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células suspensas em meio de cultivo, transferidas para placas ou garrafas para expansão das células e as mesmas foram mantidas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . O meio de cultivo foi substituído a cada 2 ou 3 dias de acordo com a necessidade.

4.7 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A análise de proliferação celular foi realizada através de ensaio do ensaio colorimétrico de MTT.

4.7.1 Ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT

O método baseia-se na medida da atividade da enzima succinato-desidrogenase mitocondrial (componente do complexo II do ciclo de Krebs), a qual, se ativa, é capaz de metabolizar o reagente MTT (3-[(4,5- dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide]), presente, portanto somente nas células viáveis, gerando formazan. O formazan é um composto azul-violeta, que uma vez precipitado a 90 g por 10 minutos e solubilizado em DMSO é quantificado por espectrofotometria.

Para tanto, aproximadamente 1×10^3 células foram plaqueadas em triplicatas em placas de 96 poços (Corning). Passada 48 horas do plaqueamento, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS e o MTT na concentração de 5mg/mL foi

diluído em meio DMEM contendo 1% SFB (1 mL MTT (Sigma Aldrich - 5mg/mL) e 9 mL de meio contendo 1% de SFB) foi adicionado e incubado por 3 horas na estufa a 37°C. Após esse período, a placa foi centrifugada e em seguida, todo o meio foi removido e o formazan foi solubilizado em 50 µL de DMSO. A leitura foi feita em espectrofotômetro (M-Quant, Bio-Bio Tek Instruments, VT, USA) em comprimento de onda de 535 nm. Os resultados obtidos neste experimento foram plotados em um gráfico de linha utilizando o programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA).

4.8 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS DE TECIDO ADIPOSEO DE GATAS

As células-tronco de gordura de gatas foram submetidas a caracterização biológica em 2 grandes esferas: celular pelas análise de expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais e de pluripotência através de ensaios de citometria de fluxo e funcional a partir de diferenciações adipo, osteo e condrogênicas.

4.8.1 Análise de Marcadores por Citometria de Fluxo

Após o crescimento e expansão celular, as células em cultura foram tripsinizadas e inativadas com soro fetal bovino, colocadas em tubos de 15 mL e centrifugadas à 90 *g* durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular suspenso em 5 mL solução salina 0,9% para lavagem e novamente centrifugado à 90 *g* durante 10 minutos. Em seguida, novamente o sobrenadante foi descartado e o tampão FACs Flow acrescentado. Em seguida, a suspensão foi transferida para tubos de citometria, e os anticorpos CD44, STRO-1 e Nanog (Santa Cruz, CA, USA) foram adicionados incubados por 15 minutos a 4°C, diluídos a 1:200 marcados com FITC. As análises de expressão foram realizadas em citômetro de Fluxo FACSCalibur (BD) em 10.000 eventos, e as aquisições foram feitas pelo programa Win Mdi 2.8. A expressão de marcadores foi

determinada pela comparação com um isotipo controle marcado com FITC inespecífico.

Para a avaliação da expressão anticorpos citoplasmáticos e nucleares Stro-1 e Nanog, as células foram permeabilizadas previamente com 10 µL de Triton X-100 (0,1%) por 30 minutos antes da adição dos anticorpos primários específicos.

Já para os outros anticorpos aproximadamente 1×10^5 células foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente com 5 µL dos anticorpos CD45, CD90, CD105, CD73, CD34 e HLA-DR (BD).

Após este período de incubação, as células foram centrifugadas durante 2 minutos a 380 g e ressuspendidas em PBS para serem submetidas ao citômetro. As análises de expressão foram realizadas em citômetro de Fluxo FACSCalibur em 10.000 eventos e as aquisições foram feitas pelo programa Win Mdi 2.8.

4.8.2 Diferenciações: adipogênica, osteogênica e condrogênica

Para as diferenciações adipogênica e osteogênica, aproximadamente 5×10^3 células foram cultivadas em placas de 24 poços em duplicatas. Para a diferenciação condrogênica foram utilizadas 1×10^6 células cultivadas no formato de precipitado em tubos cônicos de 15 ml.

A diferenciação adipogênica foi induzida durante 15 dias com meio basal contendo DMEM, 15% de soro fetal bovino e os seguintes aditivos: 10 µM de dexametosona (Decadron injetável, Schering-Plough, SP, Brasil); 10 µg/mL de insulina (Sigma Aldrich); 5 µM de indometacina (Sigma- Aldrich); 5µM de rosiglitazona (Sigma- Aldrich).

Para a manutenção das diferenciações, o meio foi trocado duas vezes por semana. Após 15 dias, as placas foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% por 24 horas. Após a fixação, as células foram novamente lavadas com álcool isopropílico a 60% e em seguida coradas com *Oil Red O* (Sigma-Aldrich), utilizando 0,36% de *Oil Red O* em álcool isopropílico a 60%. Após 20 min de incubação a temperatura ambiente o corante foi removido e as células foram

lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante. Após a remoção as lâminas foram montadas com glicerol e imediatamente analisadas em microscópio invertido Olympus BX50F4 uma vez que, o rompimento dos vacúolos após coloração é muito rápido.

Para a diferenciação osteogênica e condrogênica foram utilizados *kits* STEMPRO Osteogenesis and *Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen) e indução foi feita por 21 dias. Da mesma maneira, que as diferenciações adipogênicas, o meio foi trocado duas vezes por semana.

As células diferenciadas em osteócitos foram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos em temperatura ambiente, lavadas com PBS para remoção do excesso de paraformaldeído e coradas com 40 mM de *Alizarin Red S* em Tris pH 4,1 (Sigma- Aldrich). Passados 20 minutos da incubação, as células foram lavadas com água para a retirada do excesso de corante, essa lavagem ocorreu até não haver mais precipitado visível. Em seguida, as lâminas foram montadas com Permount (Fischer Scientific, Pittsburgh, USA) e levadas à análise em microscópio invertido Olympus BX50F4.

Para a diferenciação condrogênica utilizamos aproximadamente um milhão de células suspensas em 2 mL de PBS. Em seguida centrifugadas a 90 g durante 10 minutos e suspensas em 2 mL do meio de diferenciação do kit STEMPRO *Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen) preparado seguindo as instruções do fabricante.

As células foram novamente centrifugadas a 90 g durante 5 minutos e o botão celular foi formado, então o tubo foi colocado cuidadosamente com tampa semi aberta na estufa. Metade do meio foi trocado duas vezes por semana durante um período de no mínimo 21 dias.

Passado o período de diferenciação, as células foram lavadas com PBS e fixadas em formol tamponado a 10% durante 2h. Em seguida, elas foram diafanizadas em banhos sucessivos de álcool 50,70,90%, seguidos de 3 banhos a 100% com duração de 10 minutos cada. Ao final, a amostra foi submetida a dois banhos de xilol 100% com duração de 5 a 10 minutos, colocada em banho de paraplast líquida a 60°C em estufa seca por 30 minutos e incluídas em paraplast.

Após inclusão, cortes de 3-4 μ M foram realizados em micrótomo (Leica, RM2165) e colocados sobre lâminas. As lâminas foram secadas ao ar durante

aproximadamente 12 horas . Ao final, as amostras foram coradas com HE e Tricômio de Masson e analisadas em microscópio invertido Olympus BX50F4.

4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENÉTICO DAS CÉLULAS PROGENITORAS DE TECIDO ADIPOSEO EM CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS NUDE

Para avaliar o potencial carcinogênico das células-tronco derivadas do tecido adiposo foi realizada a injeção de aproximadamente 1×10^6 células foram aplicadas via intramuscular no membro pélvico de camundongo imunossuprimido, *nude* provenientes do Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)(Figura 3).

Para tanto, as células provenientes da técnica de tripsinização celular foram centrifugadas por três vezes durante 5 minutos a 90 *g* com PBS para retirada dos resíduos de celulares. Em seguida, as células foram suspensas em 50 μ L de solução fisiológica e aplicadas com auxílio de uma seringa de insulina. A avaliação da ocorrência de formação tumoral foi realizada durante seis semanas e após esse período foi realizada a eutanásia dos animais e realizados cortes histológicos órgãos do camundongo para verificar se houve ou não alteração da morfologia dos mesmos.

Figura 3 – Fotografia do procedimento de injeção intramuscular de células-tronco de tecido adiposo proveniente de gatas no membro pélvico esquerdo do camundongo imunossuprimidos nude.

Fonte: (SANTOS, J.P.A, 2012)

4.10 TERAPIA CELULAR DOS GATOS COM DOENÇA RENAL CRÔNICA UTILIZANDO CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE GATAS

4.10.1 Seleção dos animais

Os gatos provenientes de proprietários particulares, gatis e organizações não governamentais foram recrutados para participar do estudo. Sendo que a incidência da doença ocorre em gatos idosos, optou-se realizar os exames da triagem em animais com pelo menos 7 anos. Dessa forma, foram realizados exames de 97 gatos e destes apenas 7 animais puderam ser incluídos.

Considerando que a doença renal é caracterizada pela presença de anormalidades funcionais e estruturais em um ou ambos os rins, esta doença é diagnosticada através da redução da função renal ou presença de lesão renal. A

lesão renal pode ser diagnosticada através da detecção de lesão macro ou microscópica por biópsia ou visualização dos rins por métodos de imagem ou também através de marcadores de lesão detectados através exame de sangue e urina (ROUDEBUSH, 2009). Portanto, o critério para inclusão dos animais no estudo foi feito através de uma análise dos resultados da creatinina sérica; urinálise; razão proteína/creatinina urinária e ultrassonografia abdominal.

O primeiro exame a ser realizada foi a ultrassonografia e havendo alteração neste exame o próximo passo foi realizar tanto creatinina sérica quanto os exames de urina (urinálise e razão proteína/creatinina sérica). Caso não houvesse alteração ultrassonográfica, realizaram-se primeiro os exames de urina e de acordo com o resultado, era realizada a creatinina sérica.

Apenas foram incluídos no estudo, os animais que apresentaram alterações que indicassem a presença da doença renal crônica, quer como aumento dos níveis séricos de creatinina, diminuição das dimensões renais; perda da relação corticomedular; densidade urinária baixa.

Os fatores de exclusão do estudo foram: presença de outra doença concomitante que não esteja relacionada com a doença renal crônica como alterações renais que sejam de origem congênita ou familiar, presença de neoplasia e de processo obstrutivo em vias urinárias.

4.10.2 Protocolo da Terapia

Os animais foram divididos em três grupos:

- A. Grupo de animais doentes sem tratamento - “placebo”
- B. Grupo de animais doentes com terapia celular
- C. Grupo de animais doentes com terapia celular e reposição hídrica

A terapia celular neste projeto se baseou na injeção de aproximadamente 1×10^6 células-tronco de tecido adiposo de gata, pela via intravascular periférica, a cada 15 dias no grupo B e a cada 30 dias no grupo C, com o total de 2 aplicações, sendo que cada aplicação as células foram injetadas lentamente, num período de 10 minutos.

4.10.2 Análise da Terapia

Neste trabalho, os animais foram monitorados no momento pré e pós-injeção celular (até 48 horas), através da realização de exames complementares tais como: hemograma; determinações séricas de creatinina e avaliação de citocinas através do PCR.

4.10.2.1 Avaliação da expressão de citocinas por reação de polimerização em cadeia (PCR)

A avaliação da expressão de citocinas não foram realizadas nos animais 6 e 7 devido esta avaliação ter sido incluída no terço final do estudo e neste momento estes animais já haviam sido avaliados através dos exames complementares citados anteriormente.

As citocinas de escolha para a avaliação do tratamento da DRC em felinos foram: IL-1 β ; IL-6; IL-10; TNF- α (fator de necrose tumoral) e PPET-1 (endotelina). Para tanto, amostras entre 2 a 3mL de sangue venoso foram coletadas assepticamente e armazenadas em tubos com EDTA por um período de até 2 horas. Posteriormente, foi adicionada a mesma quantidade de PBS, então o conteúdo foi homogeneizado, transferido para um tubo cônico contendo Ficoll-Paque (GE) na proporção 1:1:1 (sangue, PBS, Ficoll-Paque). E centrifugado a 380 g por 30 minutos.

Após centrifugação houve a formação de um gradiente e a fração de células sanguíneas mononucleares foi cuidadosamente removida e transferidas para um tubo cônico contendo 15 mL de PBS e centrifugada a 380 g por 30 minutos. Então o sobrenadante foi removido e precipitado foi mantido a temperatura ambiente para secagem. Após esse evento, o precipitado obtido foi suspenso em 1 mL de Trizol e mantido no -80^o até a realização da extração do RNA.

Para a extração de RNA, as amostras foram descongeladas e 0,2 mL de clorofórmio foram adicionados, e após serem fortemente homogeneizadas e as

amostras foram centrifugadas a 12000 *g* durante 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, a fase incolor obtida, foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, 0,5 mL de álcool isopropílico foram adicionados para a precipitação do RNA e o conteúdo foi mantido no freezer *overnight*. Passado o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000 *g* durante 10 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi lavado 3 vezes com 1 mL de etanol 70 %, preparado em água DEPC (dietilpirocarbonato) e novamente centrifugado a 7500 *g* durante 5 minutos. Em seguida, o etanol foi removido e o precipitado formado secou a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos, até que não fosse possível observar gotículas de álcool na parede e antes que o precipitado fique transparente. Ao final, o RNA foi suspenso em 10-50 µL de água DEPC para ser então dosado, submetido à análise eletroforética em gel de agarose 1% e, posteriormente utilizado na síntese do cDNA utilizando o kit.

Para a reação de transcrição reversa foi utilizado 1 µg de RNA tratado com 2U DNase I (RNase free, Fermentas), 20U RNaseOUT (Invitrogen) e 1X SuperScript III Buffer (Invitrogen) e água deionizada (Milli-Q®) em um volume total de 10 µL de reação. Esta mistura foi incubada inicialmente a 37 °C por 10 min e depois a 75 °C por 5 min.

Adicionou-se, posteriormente, para cada reação 0,77 mM dNTP (Fermentas, Thermo-Scientific), 500 µg Oligo(dT)18 primer (Fermentas, Thermo-Scientific) e 1 µL água deionizada e incubou-se por 10 min a 65 °C. A seguir, acrescentou-se à reação: 1X SuperScript III Buffer (Invitrogen), 5 mM DTT (Invitrogen), 20U RNaseOUT (Invitrogen), 1 µL enzima SuperScript III Buffer (Invitrogen) e 0,5 µL água deionizada e incubou-se a 25 °C por 10 minutos, a 55 °C por 2 horas e a 75 °C por 15 min.

Por fim, foi adicionado a cada reação 1 µL RNaseH (Fermentas) e incubou-se por 30 minutos a 37 °C e por 10 minutos a 72 °C. Cada amostra (20 µL) foi diluída adicionando-se 40 µL de água deionizada e essas soluções foram armazenadas em alíquotas a -20°C.

Para normalização dos dados foi utilizado o gene endógeno GAPDH de *Felis catus*. Para análise da diferenciação foram utilizados os genes IL-1b, IL-6, IL-10, PPET-1, TNF-alfa (Tabela 1).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos sense e antisense utilizados na PCR (São Paulo, 2012)

Citocinas	Sense	Antisense
IL-1b	AATGACCTGTTCTTTGAGGCTGAT	CCAGAAACTGTGGCTCAGGTT
IL-6	CCCTGCAGACAAAATGGAAGA	GTGCCTCCTTGCTGTCCTCA
IL-10	TGCACAGCATATTGTTGACCAG	ATCTCGGACAAGGCTTGGC
TNF-a	CTTCTCGAACTCCGAGTGACAAG	CCACTGGAGTTGCCCTTCA
GAPDH	GCCGTGGAATTTGCCGT	GCCATCAATGACCCCTTCAT
PPET-1 (endotelina)	5'-TGCTCCTGCTCTTCCCTGT-3'	5'-AAGCTGTTTGTGCTGTTCC-3'

Fonte: (KIPAR ET AL. 2001; UCHIDE; SAIDA, 2006)

Os cDNAs produzidos foram então utilizados em reações de PCR em tempo real e os oligonucleotídeos utilizados neste projeto foram confeccionados de acordo com KIPAR et al. 2001; UCHIDE; SAIDA, 2006.(Tabela 1). Para a quantificação do produto formado durante a reação de PCR em tempo real foi utilizado o reagente *SYBR[®] Green Dye* (Applied Biosystems). Para a normalização dos dados, foi utilizado o *oligo* para o gene de expressão constitutiva, GAPDH, como controle interno da reação.

Para tanto, diferentes concentrações dos oligonucleotídeos foram testadas: 100, 200, 400 e 600 nM com misturas de cDNAs diluídas em séries. Com este ensaio, pode-se determinar a concentração ótima de oligos que é caracterizada como, a menor concentração onde o C_T (cycle threshold) e o perfil da curva de amplificação não apresentassem grandes variações em relação às maiores concentrações com uma menor formação de dímeros *de oligos* (quando estes estão presentes). Após escolhidas as melhores concentrações dos *oligos* tanto do endógeno quanto dos *oligos* a serem analisados (Tabela 2), a melhor concentração de cada *oligos* foi testada com diferentes concentrações de cDNA: 1:10, 1:30, 1:60, 1:120, 1:240 e 1:480.

A padronização dos oligos por PCR em tempo real mostrou que as sequências de oligonucleotídeos escolhidas eram eficientes para a amplificação.

Tabela 3 - Concentrações de oligonucleotídeos selecionadas para utilização nas reações de qRT-PCR.

Oligonucleotídeos	Concentração (nM)
GAPDH	200
Il-1b	400
IL-6	400
Il-10	400
PPET-1	200
TNF-alfa	200

Fonte: (SANTOS, J.P.A, 2012)

A análise de regressão linear dos valores de C_T s em função do logaritmo da respectiva diluição fornece o coeficiente angular da reta (a, em $y=ax+b$) que é utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos oligos, na seguinte fórmula:

$$Ef = 10^{-1/\text{coeficiente angular}}$$

$$Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$$

Em seguida foram realizados os testes de nível de expressão gênica dos genes de interesse em cada amostra por PCR em tempo real, utilizando as concentrações de *oligo* e de cDNA escolhidas na padronização. Assim, a expressão do gene alvo foi determinada em relação à expressão do gene controle. Após a obtenção dos C_T s de cada amostra, inicialmente, foi calculada a média dos C_T s das réplicas (N=3). Dado que a expressão do gene é analisada em relação a uma amostra que é tomada como referência, calcula-se então a diferença entre a média dos C_T s da amostra referência e a média dos C_T s da amostra estudada. Essa diferença é definida como ΔC_p (crossing point). O cálculo do ΔC_p é realizado para os dados do gene alvo e para os dados do gene de expressão constitutiva. A fórmula final para o cálculo da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, que considera que não há um ganho de duas vezes do produto

amplificado a cada ciclo, dado que a eficiência de amplificação dos *oligos* utilizados não é de 100%, é dada por:

$$ratio = \frac{Ef_{\text{genealvo}}^{\Delta CP_{\text{genealvo}}}}{Ef_{\text{controle endógeno}}^{\Delta CP_{\text{controle endógeno}}}}$$

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Mudanças na creatinina sérica, hematócrito, leucócitos, eosinófilos, densidade urinária, razão proteína/creatinina urinária e expressão das citocinas séricas foram avaliadas por medidas repetidas ANOVA, seguido pela correção de Bonferroni. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando a linguagem R versão 2.12 (R Developmental Core Team 2010, Vienna, Austria).

6 RESULTADOS

6.1 TESTE DIAGNÓSTICO FIV/FELV

Os resultados de teste ELISA para detecção da proteína p27 do FELV e anticorpos anti-FIV foram realizados em laboratório privado especializado para essa finalidade e o resumo dos resultados está descrito na Tabela 2:

Tabela 3 – Resultados do teste ELISA para detecção dos vírus da FIV e FELV nas gatas doadoras de tecido adiposo deste estudo (São Paulo, 2012).

Amostras	FIV	FELV	Observações
G1	Negativo	Negativo	
G2	Negativo	Negativo	
G3	-	-	Amostra insuficiente
G4	Negativo	Negativo	
G5	Negativo	Negativo	
G6	-	-	Amostra contaminada
G7	Negativo	Negativo	
G8	-	-	Amostra insuficiente
G9	Negativo	Negativo	
G10	Negativo	Negativo	

Fonte: (SANTOS, JPA, 2012)

Observe que foram realizadas 10 coletas de tecido adiposo sendo que apenas 3 (G3, G6 e G8) não puderam ser analisadas por motivos de amostras insuficiente (G3, G8) ou contaminada (G6) e por isso, não foram utilizadas no nossos protocolos.

6.2 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DO TECIDO ADIPOSEO DE GATAS

As células foram cultivadas em meio DMEM alta glicose contendo 15% de soro fetal bovino e 1 % de estreptomicina/penicilina.

Durante a observação microscópica das células, após 48-72 horas, do início do cultivo observamos que as primeiras células aderentes ao plástico já possuíam formato fibroblástoide característico de CTM (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografia das células-tronco de tecido adiposo de gatas após 7 dias de coleta apresentando formato e fibroblastóide.

Fonte: PASSOS, J.P.A., 2012

Legenda: Observe que adjacente às células, há evidências de resquícios de tecido adiposo bem como de restos celulares. A) Células provenientes da coleta G2 e B) Células provenientes da coleta G3.

Ao atingirem confluência de 80% (Figura 4), as células foram submetidas ao processo de repique e expandidas em placa de 60 mm. Com o objetivo de manter um estoque destas células, as mesmas após expansão foram submetidas ao processo de criopreservação que se mostrou efetivo e sem danos a este tipo celular.

Figura 5 – Fotomicrografia das células-tronco de tecido adiposo de gatas em estágio de semi confluência.

Fonte: (SANTOS, J.P.A, 2012)

As amostras G2, G3, G9 e G10 confluíram bem, não houve nenhuma contaminação, portanto foram expandidas e armazenadas em nitrogênio líquido. Convém ressaltar, que a amostra G2 e G9 se mostraram uma amostra bem viável em cultivo, com ótimo crescimento celular e boa aceitação a criopreservação uma vez que, foi descongelada, expandida e novamente congelada e com isso, foram escolhidas para expansão, caracterização e realização das terapias.

6.3 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para a análise de proliferação celular utilizamos o ensaio colorimétrico de viabilidade celular por MTT.

6.3.1 Ensaio colorimétrico de viabilidade celular por MTT

Com o objetivo de analisar a viabilidade celular o ensaio colorimétrico de MTT também foi realizado durante 10 dias e a Figura 6 representa o resultado obtido neste experimento onde, pudemos observar que as células-tronco provenientes do tecido adiposo cresceram constantemente e ao final de 10 dias houve uma pequena queda, característico de CTM.

Figura 6 – Análise da proliferação celular das células de gordura pelo método colorimétrico de MTT.

Fonte: (SANTOS, J.P.A, 2012)

6.4 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO DE GATAS

Como relatado em materiais e métodos, as células-tronco de gordura de gatas foram submetidas a caracterização biológica em duas grandes esferas: a celular para a análise de expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais e de pluripotência através de ensaios de citometria de fluxo e a funcional a partir de diferenciações celulares.

6.4.1 Citometria de fluxo

As células-tronco de tecido adiposo de gatas foram submetidas à técnica de citometria de fluxo utilizando os seguintes anticorpos monoclonais CD44, CD90, CD45, CD34, HLA-DR, Stro-1 e Nanog.

Através destes ensaios verificamos que as mesmas possuem certo grau de indiferenciação, pois foram positivas para Stro-1 e Nanog que são marcadores de pluripotência e foram positivas para CD44+, um dos marcadores de células-tronco mesenquimais (Figura 7).

Figura 7 – Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo das células-tronco derivadas do tecido adiposo de gatas na forma de histogramas.

Fonte:(SANTOS, JPA, 2012)

Legenda: Estas células expressaram CD44, Stro-1 e Nanog

Já na figura 8, observamos que as células apresentaram aproximadamente 50% de expressão de CD90, marcador específico de células-tronco mesenquimais, embora não expressaram CD73, CD105 que também são marcadores específicos de células-tronco mesenquimais. Entretanto, o teste para CD45, CD34, HLA-DR foi negativo, como o esperado para células-tronco mesenquimais.

Figura 8 – Análise da expressão dos marcadores de superfície de células-tronco derivadas do tecido adiposo de gatos pela citometria de fluxo.

Fonte:(SANTOS, JPA, 2012)

Legenda: As células-tronco derivadas do tecido adiposo expressaram CD90, mas não expressaram CD45, CD34 e HLA-DR, CD73, CD105.

6.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO DAS CÉLULAS PROGENITORAS DE TECIDO ADIPOSEO EM CAMUNDONGO IMUNOSSUPRIMIDOS NUDE

Após a injeção via intramuscular de aproximadamente 1×10^6 células no membro pélvico esquerdo de camundongos imunossuprimidos *nude*, os camundongos foram monitorados semanalmente durante 60 dias. Até 60 dias da inoculação não foi possível observar macroscopicamente nenhuma formação tumoral. Passado este período, a eutanásia do animal foi realizada seguindo recomendações do Comitê de Ética e os seguintes órgãos: fígado, coração, musculatura do membro pélvico esquerdo, cérebro, pulmão e rins foram coletados e analisados macro e microscopicamente.

Como relatado acima, macroscopicamente não foi visibilizada nenhuma alteração dos órgãos (Figura 9). Já, através da histologia foi possível visibilizar a

homogeneidade estrutural dos órgãos confirmando a ausência de tumores (Figura 10).

Figura 9 – Imagem macroscópica dos órgãos do camundongo imunossuprimido nude injetados com células-tronco do tecido adiposo de gatas após eutanásia.

Fonte: (SANTOS, JPA, 2012)

Legenda: A) fígado, B) rim, C) baço, D) membro pélvico (local da injeção).

Figura 10 – Fotomicrografia dos órgãos de camundongo imunossuprimido *nude* após 60 dias da injeção de 1×10^6 células-tronco de tecido adiposo de gatas. Os órgãos foram submetidos a protocolos histológicos padrões e foram corados por HE

Fonte: (SANTOS, JPA, 2012)

Legenda: A) baço; B) cérebro; C) rim; D) coração; E) fígado; F) pulmão.

6.6 DIFERENCIAÇÕES OSTEOGÊNICA, ADIPOGÊNICA E CONDROGÊNICA

Em relação à diferenciação adipogênica após 5-7 dias do cultivo com meio indutor já observamos a presença de vacúolos lipídicos. Com o tempo, o número de vacúolos foi aumentando e, após 14 dias foi realizada a coloração com *Oil Red* onde pudemos comprovar presença de vacúolos lipídicos (Figura 11B).

A Figura 11A representa o controle da reação onde às células foram cultivadas em meio de cultivo não contendo os agentes indutores.

Figura 11 - Fotomicrografia diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de gatas, coradas com Oil Red.

. Fonte: (SANTOS, JPA, 2012)

Legenda: A) Observa-se a não diferenciação de células cultivadas em meio controle; B) Observa-se a formação de vacúolos de gordura (em vermelho) das células-tronco de tecido adiposo de gatas cultivadas com meio de diferenciação. Em A) aumento de 20X.

Na Figura 12 mostramos o resultado obtido com a diferenciação osteogênica, onde o início da mineralização da matriz extracelular aconteceu por volta de 7 dias de cultivo com meio de indução e ficou com maior evidência aos 21 dias de cultivo, data que as células foram coradas com alizarina red. A Figura 12A representa as células utilizadas como controle e a 12B indica que a matriz extracelular estava rica em cálcio e por isso a coloração vermelha.

Figura 12 – Fotomicrografia das células-tronco do tecido adiposo de gatas após diferenciação das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo em linhagem osteogênica, coradas com vermelho de alizarina.

Fonte: (SANTOS, J.P.A., 2012)

Legenda: A) Observa-se a não diferenciação das células cultivadas em meio controle não contendo agentes indutores; B) Células diferenciadas em osteócitos, com para a visibilização de calcificação após coloração de vermelho de alizarina..

No precipitado celular cultivado com meio condrogênico houve a formação de uma matriz cartilaginosa após 21 dias de cultivo como mostra a Figura 13B, a Figura 13A representa o controle onde não pudemos observar a formação da matriz cartilaginosa. quando coradas com Tricômio de Masson, como esperado.

Figura 13 - Fotomicrografia diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de gatas, coradas com Tricômio de Masson.

Fonte: (SANTOS, J.P.A., 2012)

Legenda: Em (A) Observa-se a não diferenciação de células cultivadas em meio controle. Em (B) Observa-se as fibras colágenas em azul

6.7 TERAPIA CELULAR

Neste estudo foram realizados exames de triagem de 97 animais. Os resultados dos parâmetros analisados no processo de triagem estão apresentados no anexo B.

Diante dos resultados obtidos na triagem, algumas análises foram realizadas e na Figura 14 temos a comparação dos valores de creatina sérica versus densidade urinária entre animais que apresentaram alteração renal pelo exame ultrassonográfico. Os animais do grupo chamado de “normal” são aqueles que não apresentaram alteração ultrassonográfica e o grupo “alterado” apresentaram alterações.

Entendem-se como alteração ultrassonográficas as seguintes características: perda da distinção da região corticomedular e/ou diminuição do tamanho renal. Sendo que essas duas alterações podem estar associadas com o aumento de ecogenicidade renal.

Podemos observar que os animais do grupo "alterado" apresentaram valores maiores de creatinina, mesmo quando a urina apresentava-se concentrada, ou seja, a ultrassonografia demonstrou ser um exame essencial na caracterização da doença.

Houve poucas observações de animais com densidade baixa de urina para animais do grupo "alterado", ou seja, mesmo que o rim apresente diminuição das dimensões e perda de definição, a urina permanecia concentrada em alguns casos.

Quanto aos animais do grupo "normal", a tendência foi de diminuição do nível sérico de creatinina quando é observado o aumento da concentração urinária.

Figura 14 – Comparação dos valores de creatina sérica versus densidade urinária entre animais que apresentaram alteração renal pelo exame ultrassonográfico.

Fonte: (SANTOS, J.P.A., 2012)

Legenda: Considera-se densidade normal acima de 1035 e baixa com valores abaixo de 1035. Sendo que os animais do grupo “normal” são aqueles que não apresentaram alteração ultrassonográfica e o grupo “alterado” apresentaram alterações no exame ultrassonográfico.

Na figura 15 observamos que não há influência do sexo tanto na densidade urinária quanto nos valores séricos de creatinina.

Figura 15- Comparação creatinina sérica versus densidade da urina nos diferentes sexos.

Fonte: (SANTOS, J.P.A., 2012)

Legenda: Considera-se densidade normal acima de 1035 e baixa com valores abaixo de 1035.

De acordo com os resultados da triagem foi possível incluir no estudo 12 animais, porém, destes, cinco vieram a óbito antes da realização da terapia celular; um houve a desistência por parte do proprietário e outro apresentou valores normais nos exames de creatinina e densidade urinária no momento pré-injeção, e como não havia alteração ultrassonográfica para justificar uma alteração renal, o animal foi excluído. Portanto a terapia celular foi realizada em cinco animais, sendo que no momento da triagem, quatro pertenciam ao estágio três da doença (Animais 3,4,6,7 da Tabela 4) e um pertencia ao estágio dois da doença (Animal 5 da Tabela 4), de acordo com a IRIS. Além disso, dois animais participaram do grupo placebo, sendo um do estágio dois e um do estágio três da doença (Animais 1 e 2 da Tabela 4).

Tabela 4 - Animais incluídos no estudo, com dados de creatinina sérica; densidade urinária; razão proteína/creatinina urinária e ultrassonografia

Grupos	Sexo	Creatinina	IRIS	Densidade urinária	Razão proteína/creatinina	Ultrassonografia
A						
1	M	2,15	II	1030	0,09	Rins sem alterações
2	M	3,45	III	1036	0,23	Rim esquerdo com aumento de ecogenicidade da cortical e perda da relação corticomedular
B						
3	M	3,65	III	1036	0,23	Rim esquerdo com aumento de ecogenicidade da cortical e perda da relação corticomedular
4	F	3,0	III	>1040	0,17	Rim direito diminuído, perda relação corticomedular e aumento de ecogenicidade cortical
5	M	2,0	II	>1040	0,24	Aumento de ecogenicidade cortical e perda da relação corticomedular
C						
6	M	4,0	III	1008	0,17	Rim direito diminuído, perda relação corticomedular e aumento de ecogenicidade cortical
7	F	3,3	III	1020	0,15	Rim direito diminuído, perda relação corticomedular e aumento de ecogenicidade cortical

Fonte: (SANTOS, J.P.A, 2012)

Legenda: Os valores de referências são 0,8-1,8 mg/dl para creatinina; razão proteína/creatinina urinária < 0,5 segundo Grauer e < 0,2 segundo a IRIS; tamanho renal maior que 3,0 cm.

O animal 1 da Tabela 4 é um macho, sem raça definida, pesando 2,5 Kg, com idade aproximada de 7 anos que já apresentava histórico de tratamento para a doença renal crônica, porém no momento da triagem foi relatado pelo proprietário que o animal estava sem tratamento há 2 meses. Foram realizados exames de ultrassonografia, creatinina sérica, urinálise e razão proteína/creatinina urinária para

caracterizar o grau da doença (Tabela 4). Este animal pertence ao estágio 2 da doença, não proteinúrico tanto de acordo com Grauer como com a IRIS.

O animal 2 (Tabela 4) é um macho, sem raça definida, pesando 4 kg, com idade aproximada de 10 anos. De acordo com a o proprietário, o animal não apresentava nenhuma alteração, porém durante o exame ultrassonográfico foi possível observar que o rim esquerdo apresentava aumento de ecogenicidade da cortical, perda da distinção corticomedular e diminuição das dimensões quando comparado com o rim direito. Portanto também realizamos o exame de creatinina sérica, urinálise e razão proteína/creatinina. De acordo com os resultados, este animal se apresentava no estágio 3 da doença e suspeito de proteinúria de acordo com a IRIS (Tabela 4). O animal 3 é o mesmo que o animal 2, porém no momento pós placebo, ainda se apresentando no estágio 3 da doença.

O animal 4 é uma fêmea, sem raça definida, pesando 3,5 kg, com idade aproximada de 10 anos. De acordo com a o proprietário, o animal não apresentava nenhuma alteração, porém durante o exame ultrassonográfico foi possível observar que o rim direito apresentava aumento de ecogenicidade da cortical, perda da distinção corticomedular e diminuição das dimensões (Figura 16). Portanto também realizamos o exame de creatinina sérica, urinálise e razão proteína/creatinina. De acordo com os resultados, este animal se apresentava no estágio 3 da doença acordo com a IRIS (Tabela 4).

O animal 5 é uma macho, sem raça definida, pesando aproximadamente 3,5 kg, com idade aproximada de 9 anos. Já apresentava histórico de tratamento para a doença renal crônica, porém no momento da triagem foi relatado pelo proprietário que o animal estava sem tratamento. Foram realizados exames de ultrassonografia, creatinina sérica, urinálise e razão proteína/creatinina urinária para caracterizar o grau da doença (Tabela 4). Com o exame ultrassonográfico foi possível visibilizar que os rins apresentavam aumento de ecogenicidade da cortical e perda da definição corticomedular. De acordo com a IRIS este animal pertence ao estágio 2 da doença, e suspeito de proteinúria.

O animal 6 é um macho, da raça siamês, pesando aproximadamente 2,5 kg, com idade aproximada de 10 anos e estava em tratamento com solução fisiológica

em subcutâneo 1 vez por semana. Mesmo com o tratamento a animal se apresentava no estágio 3 da doença e não proteinúrico de acordo com a IRIS.

O animal 7 é uma fêmea, da raça persa, pesando aproximadamente 3,5 kg, com idade aproximada de 10 anos e estava em tratamento com solução fisiológica em subcutâneo 1 vez por semana. Mesmo com o tratamento a animal se apresentava no estágio 3 da doença e não proteinúrico de acordo com a IRIS.

Figura 16 – Ultrassonografia renal dos gatos do grupo tratamento

Fonte: (SANTOS, J.P.A, 2012)

Legenda: ., A) imagem do rim direito do animal 4, mostrando aumento de ecogenicidade cortical e perda da distinção corticomedular; B) imagem do rim direito do animal 7 mostrando com aumento de ecogenicidade cortical; C) imagem do rim direito do animal 6 mostrando aumento de ecogenicidade cortical e perda da distinção corticomedular; D) imagem do rim esquerdo do animal 2 e 3 mostrando aumento de ecogenicidade cortical e perda da distinção corticomedular; E) imagem do rim esquerdo do animal 5; F) imagem do rim direito do animal 5 mostrando aumento de ecogenicidade cortical e perda da distinção corticomedular

Nas Tabelas 5 e 6 apresentamos os resultados obtidos no momento pré e pós-placebo dos animais 1 e 2, respectivamente.

De acordo com a tabela 5 podemos observar que o animal 1 apresentou ao longo do tempo uma diminuição muito discreta da creatinina manteve a densidade

urinária baixa, não houve alteração da razão proteína/creatinina urinária e houve diminuição do hematócrito, porém dentro dos limites da normalidade. Em relação aos demais parâmetros, este animal apresentou valores dentro da normalidade, exceto em relação aos eosinófilos, pois o animal apresentou eosinofilia nos 2 últimos exames.

Tabela 5 – Resultados dos exames pré e pós-placebo do animal 1 (São Paulo, 2012).

Exame	Resultado pré 1º placebo	Resultado pós 1º placebo	Resultados pré 2º placebo	Resultado pós 2º placebo	Valores de referência
Eritrócitos	7,38	7,23	6,58	6,42	5.5-10 milhões/ μ L
Hemoglobina	13,20	13	11,8	11,8	8-15 mg/dL
Hematócrito	52	42,7	40	39,7	25-40 %
VGM	70,46	59,06	60,79	61,84	39-55 μ 3
HGM	17,89	17,98	17,93	18,38	13-17 pg
CHGM	25,38	30,44	29,5	29,72	30-35 g/dL
Leucócitos	14.900	12600	15000	12400	5.500 –19.000 / μ L
Metamielócitos	0	0	0	0	0
Bastonetes	0	0	0	0	0-300/ μ L
Segmentados	10281	9324	9900	8060	2.500-12.500/ μ L
Eosinófilos	149	378	1050	868	100-750/ μ L
Basófilos	0	0	0	0	Raros
Linfócitos	4321	2520	3600	3472	1.500-7.000/ μ L
Monócitos	149	378	450	0	100-800/ μ L
Proteínas totais	7,0	6,6	6,4	7,5	5.5-7.5 g/dL
Creatinina	2,25	2,05	1,95	1,95	0.8-1.8 mg/dL
Densidade urinária	1030	-	-	1030	1035
Razão proteína/ creatinina urinária	0,09	-	-	0,09	< 0,5 segundo Grauer e < 0,2 segundo a IRIS

Fonte: SANTOS, JPA, 2012

Em relação ao animal 2 (Tabela 6) observamos ao longo do tempo, discreto aumento da creatinina e a diminuição da densidade urinária. Houve também uma

discreta diminuição do hematócrito, uma considerável eosinofilia e hiperproteinemia constante. Os demais parâmetros se mantiveram dentro dos padrões da normalidade.

Tabela 6 – Resultados dos exames pré e pós-placebo do animal 2 (São Paulo, 2012).

Exame	Resultado pré 1º placebo	Resultado pós 1º placebo	Resultados pré 2º placebo	Resultado pós 2º placebo	Valores de referência
Eritrócitos	8,15	7,37	7,3	7,37	5.5-10 milhões/ μ L
Hemoglobina	11	9,8	9,8	9,6	8-15 mg/dL
Hematócrito	32	29,7	31,3	29,6	25-40 %
VGM	39,26	40,3	42,88	40,16	39-55 μ 3
HGM	13,5	13,3	13,42	13,03	13-17 pg
CHGM	34,38	33	31,31	32,43	30-35 g/dL
Leucócitos	8300	9500	8700	9500	5.500 –19.000 / μ L
Metamielócitos	0	0	0	0	0
Bastonetes	0	0	0	0	0-300/ μ L
Segmentados	5561	5700	4611	5985	2.500-12.500/ μ L
Eosinófilos	830	475	435	1520	100-750/ μ L
Basófilos	0	0	0	0	Raros
Linfócitos	1909	3135	3654	1710	1.500-7.000/ μ L
Monócitos	0	190	0	285	100-800/ μ L
Proteínas totais	8,4	8,6	8,2	8	5.5-7.5 g/dL
Creatinina	3,45	3,15	3,65	3,65	0.8-1.8 mg/dL
Densidade urinária	1036	-	-	1020	1035
Razão proteína/ creatinina	0,23	-	-	0,23	< 0,5 segundo Grauer e < 0,2 segundo a IRIS

Fonte: (SANTOS, J.P.A, 2012)

Nas Tabelas de 7 a 11, apresentamos os resultados dos exames obtidos no momento pré e pós-tratamento com células-tronco dos animais 3 a 7.

O animal 3 no momento da triagem apresentou creatinina sérica de 3,45 mg/dL, porém no momento pré-injeção seu valor foi de 5,45 mg/dL. Neste animal realizamos somente uma única injeção devido este ter apresentado um considerável

aumento da creatinina entre a triagem e a primeira injeção, demonstrando a necessidade de uma terapia convencional. Os resultados deste animal (Tabela 7) mostram que houve uma discreta diminuição da creatinina diminuição do hematócrito, porém dentro dos padrões da normalidade. Entretanto, a densidade urinária se manteve baixa e houve diminuição dos eosinófilos em relação ao momento pré-injeção.

Tabela 7 – Resultados dos exames pré e pós-tratamento do animal 3 (São Paulo, 2012).

Exame	Resultado pré 1º injeção	Resultado pós 1º injeção	Valores de referência
Eritrócitos	7,2	6,4	5.5-10 milhões/ μ L
Hemoglobina	9,3	8,4	8-15 mg/dL
Hematócrito	30	25,1	25-40 %
VGM	41,67	39,1	39-55 μ 3
HGM	12,92	13,08	13-17 pg
CHGM	31	33,47	30-35 g/dL
Leucócitos	7000	7100	5.500 –19.000 / μ L
Metamielócitos	0	0	0
Bastonetes	0	0	0-300/ μ L
Segmentados	4060	4544	2.500-12.500/ μ L
Eosinófilos	910	355	100-750/ μ L
Basófilos	0	0	Raros
Linfócitos	2030	2201	1.500-7.000/ μ L
Monócitos	0	0	100-800/ μ L
Proteínas totais	9,1	8,5	5.5-7.5 g/dL
Creatinina	5,45	4,85	0.8-1.8 mg/dL
Densidade urinária	1020	1020	1035
Razão proteína/ creatinina	0,23	0,11	< 0,5 segundo Grauer e < 0,2 segundo a IRIS

Fonte: (SANTOS, J.P.A, 2012)

O animal 4 (Tabela 8) apresentou ao longo do tempo diminuição da creatinina e manteve a hiperproteinemia. A densidade urinária, a razão

proteína/creatinina urinária e o hematócrito se apresentaram dentro dos parâmetros da normalidade.

Tabela 8 – Resultados dos exames pré e pós-tratamento do animal 4 (São Paulo, 2012).

Exame	Resultado pré 1º placebo	Resultado pós 1º placebo	Resultados pré 2º placebo	Resultado pós 2º placebo	Valores de referência
Eritrócitos	8,85	8,22	8,28	8,04	5.5-10 milhões/ μ L
Hemoglobina	12,2	11,6	12	11,2	8-15 mg/dL
Hematócrito	37,4	36,1	38	37,5	25-40 %
VGM	42,26	43,92	45,89	46,64	39-55 μ 3
HGM	13,79	14,11	14,49	13,93	13-17 pg
CHGM	32,62	32,13	31,58	29,85	30-35 g/dL
Leucócitos	5500	11000	11700	7900	5.500 –19.000 / μ L
Metamielócitos	0	0	0	0	0
Bastonetes	0	0	0	0	0-300/ μ L
Segmentados	3960	4730	6201	3871	2.500-12.500/ μ L
Eosinófilos	330	550	585	395	100-750/ μ L
Basófilos	0	0	0	0	Raros
Linfócitos	1210	5610	4914	3634	1.500-7.000/ μ L
Monócitos	0	110	0	0	100-800/ μ L
Proteínas totais	8,9	7,8	7,9	8,5	5.5-7.5 g/dL
Creatinina	2,05	1,65	2,55	1,65	0.8-1.8 mg/dL
Densidade urinária	1040	-	-	1040	1035
Razão proteína/ creatinina	0,17	-	-	0,18	< 0,5 segundo Grauer e < 0,2 segundo a IRIS

Fonte: (SANTOS, J.P.A., 2012)

O animal 5 (Tabela 9) apresentou, ao longo do tempo, aumento de creatinina, diminuição da densidade urinária, diminuição da razão proteína/creatinina urinária, aumento do hematócrito e eosinofilia.

Tabela 9 – Resultados dos exames pré e pós-tratamento do animal 5 (São Paulo, 2012).

Exame	Resultado pré 1º placebo	Resultado pós 1º placebo	Resultados pré 2º placebo	Resultado pós 2º placebo	Valores de referência
Eritrócitos	7,5	11,3	6,5	7,73	5.5-10 milhões/ μ L
Hemoglobina	10,6	16,2	9,1	10,8	8-15 mg/dL
Hematócrito	33,1	38,8	28,4	36,8	25-40 %
VGM	44,13	34,2	43,69	47,61	39-55 μ 3
HGM	14,13	14,3	14	13,97	13-17 pg
CHGM	32,02	41,7	32,04	29,35	30-35 g/dL
Leucócitos	12300	11200	16400	9700	5.500 –19.000 / μ L
Metamielócitos	0		0	0	0
Bastonetes	0		0	0	0-300/ μ L
Segmentados	9348		11972	6014	2.500-12.500/ μ L
Eosinófilos	369	770	1640	970	100-750/ μ L
Basófilos	0		0	0	Raros
Linfócitos	2583	1797	2460	2610	1.500-7.000/ μ L
Monócitos	0		328	97	100-800/ μ L
Proteínas totais	8,9		9,1	9	5.5-7.5 g/dL
Creatinina	2,15	3,15	2,95	3,25	0.8-1.8 mg/dL
Densidade urinária	1040	-	-	1036	1035
Razão proteína/ creatinina	0,24	-	-	0,16	< 0,5 segundo Grauer e < 0,2 segundo a IRIS

FONTE: (SANTOS, J.P.A, 2012)

Na Tabela 10 apresentamos os resultados dos exames do animal 6 e observamos que a creatinina foi aumentando longo do tempo; manteve a densidade urinária abaixo dos níveis de normalidade; o hematócrito apresentou discreto aumento; a razão proteína creatinina urinária se manteve constante e não foi observadas alterações nos demais parâmetros.

Tabela 10 – Resultados dos exames pré e pós-transplante celular do animal 6 (São Paulo, 2012).

Exame	Resultado pré 1º injeção	Resultado pós 1º injeção	Resultados pré 2º injeção	Resultado pós 2º injeção	Valores de referência
Hemácias	3,18	3,82	3,8	3,82	5.5-10 milhões/ μ L
Hemoglobina	4,9	5,9	5,9	5,8	8-15 mg/dL
Hematócrito	16,2	19,3	22,7	18,3	25-40 %
VGM	50,94	50,52	59,74	47,91	39-55 μ 3
HGM	15,41	15,45	15,53	15,18	13-17 pg
CHGM	30,25	30,57	25,99	31,69	30-35 g/dL
Leucócitos	14.100	14.500	12.600	12.000	5.500 –19.000 / μ L
Neutrófilos	12.831	12470	10.836	9.840	5.500-19.000/ μ L
Metamielócitos	0	0	0	0	0
Bastonetes	0	0	0	0	0-300/ μ L
Segmentados	12.831	12.470	10.836	9.840	2.500-12.500/ μ L
Eosinófilos	0	435	252	240	100-750/ μ L
Basófilos	0	0	0	0	Raros
Linfócitos	1.269	1305	1512	1800	1.500-7.000/ μ L
Monócitos	0	290	0	120	100-800/ μ L
Proteínas totais	7,8	8,5	7,4	7,8	5.5-7.5 g/dL
Creatinina	4,45	5,05	4,95	5,65	0.8-1.8 mg/dL
Densidade urinária	1008	1006	1006	1007	1040
Razão proteína/ creatinina	0,17	0,17	-	0.17	< 0,5 segundo Grauer e < 0,2 segundo a IRIS

FONTE: (SANTOS, J.P.A, 2012)

O animal 7 (Tabela 11) apresentou, ao longo do tempo, aumento dos níveis de creatinina sérica; a densidade urinária se manteve baixa; o hematócrito com valores semelhantes; a hiperproteinemia se manteve; diminuição dos eosinófilos e por fim não apresentou alterações nos demais parâmetros.

Tabela 11 – Resultados dos exames pré e pós-transplante celular do animal 7 (São Paulo, 2012).

Exame	Resultado pré 1º injeção	Resultado pós 1º injeção	Resultados pré 2º injeção	Resultado pós 2º injeção	Valores de referência
Hemácias	7,98	7,09	8,03	8,06	5.5-10 milhões/ μ L
Hemoglobina	11,6	10,6	11,8	11,6	8-15 mg/dL
Hematócrito	32,8	29,3	33,7	32,8	25-40 %
VGM	41,1	41,33	41,97	40,69	39-55 μ 3
HGM	14,54	14,95	14,69	14,39	13-17 pg
CHGM	35,37	36,18	35,01	35,37	30-35 g/dL
Leucócitos	8.900	7.100	7.600	7.500	5.500 –19.000 / μ L
Neutrófilos	5251	4615	4332	5100	5.500-19.000/ μ L
Metamielócitos	0	0	0	0	0
Bastonetes	0	0	0	0	0-300/ μ L
Segmentados	5251	4615	4332	5100	2.500-12.500/ μ L
Eosinófilos	890	852	608	375	100-750/ μ L
Basófilos	0	0	0	0	Raros
Linfócitos	2759	1633	2660	2025	1.500-7.000/ μ L
Monócitos	0	0	0	0	100-800/ μ L
Proteínas totais	7,8	7,5	7,8	8,2	5.5-7.5 g/dL
Creatinina	2,65	3,35	3,05	3,55	0.8-1.8 mg/dL
Densidade urinária	1020	1020	1021	1022	1040
Razão proteína/ creatinina	0,15	-	-	0,18	< 0,5 segundo Grauer e < 0,2 segundo a IRIS

FONTE: (SANTOS, J.P.A, 2012)

De acordo as análises estatísticas, quando considerado o fator tempo, os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros avaliados, ou seja, os valores de creatinina sérica, hematócrito, leucócitos, eosinófilos, densidade urinária, razão proteína/creatinina urinária não variaram ao longo do tempo, independente do grupo.

Quando considerado somente o fator grupo, não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros avaliados entre os diferentes grupos, exceto

em relação à densidade urinária, onde encontramos diferença entre o grupo B e C, sendo que o grupo B apresentou densidade maior que o grupo C (1032,66 versus 1014,25, respectivamente, $p < 0,05$).

Como mostra a Figura 17, a creatinina sérica apesar de estar mais elevada no grupo C do que nos outros grupos, não há diferença significativa. Quanto ao hematócrito, o grupo terapia C apresentou porcentagens menores, porém não houve diferença entre os grupos. Em relação à razão proteína/creatinina urinária apesar da queda no grupo apresentada pelo grupo B, não houve diferença entre os grupos (Figura 18).

Figura 17 – Mudanças dos valores de creatinina sérica e hematócrito de todos os grupos ao longo do tempo.

FONTE: (SANTOS, J.P.A, 2012)

Legenda: A creatinina apesar de estar mais elevada no C do que nos outros grupos não apresentou diferença significativa. O grupo C apresentou porcentagem menor de hematócrito, porém não houve diferença entre os grupos.

Figura 18 – Mudanças dos valores de densidade urinária e razão proteína/creatinina urinária.

FONTE: (SANTOS, J.P.A, 2012)

Legenda: A densidade urinária apresentou diferença significativa entre os grupos B e C. Em relação à razão proteína creatinina urinária apesar da queda no grupo B não houve diferença entre os grupos.

Realizamos também correlações entre a creatinina sérica e a razão proteína creatinina e os resultados demonstram que o grupo placebo foi o único que apresentou correlação positiva ($R^2 = 0.95$; $p < 0.05$), ou seja, a razão proteína/creatinina aumentou conforme o aumento de creatinina de forma significativa (Figura 19).

Figura 19 – Correlação entre creatinina sérica e razão proteína/creatinina urinária entre os diferentes grupos.

Fonte: (SANTOS, J.P.A, 2012)

Legenda: O grupo A mostra que a razão proteína/creatinina acompanha o aumento de creatinina de forma significativa ($R^2 = 0.95$; $p < 0.05$) e nos outros grupos esse aumento não é significativo.

Na Figura 20A representa os resultados obtidos das análises das expressões das citocinas do animal 1, pertencente ao grupo A. Observamos que houve um aumento na expressão em torno de 12 % da IL10 após 48h (D2) da primeira aplicação de placebo e esse valor diminui um pouco chegando em torno de 10% 15 dias após (D15) chegando a níveis baixíssimos 48 horas após a segunda aplicação de placebo (D17), sendo próximo ao valor de D0.

Quando analisamos a expressão de IL1 β observamos que 48h após o tratamento a expressão aumentou e em torno de 5% e esse mesmo valor foi encontrado após 15 dias do tratamento e após 2 dias da segunda aplicação de placebo (D17) e observamos que esse valor aumentou um pouco mais chegando em torno de 10%.

A expressão da IL-6 antes foi baixa (2%) antes da aplicação do placebo e este valor se duplica 48h após (D2), chegando a aproximadamente 65% 15 dias após a primeira aplicação de placebo e diminuiu sensivelmente na última avaliação.

Já, a expressão de TNF-alfa foi baixa e constante em todos os momentos. A expressão da PPET-1 aumentou chegando em torno de 25% 48h após a aplicação de placebo e diminui com o passar do tempo.

Na Figura 20B temos os resultados referentes ao animal 2, observe que todas citocinas analisadas neste animal estão com níveis altos antes da aplicação do placebo e diminuem drasticamente exceto a IL6 que tem um aumento após 15 dias da primeira aplicação porém diminui a níveis baixíssimos após a segunda aplicação de placebo.

Figura 20 - Análise da Expressão Relativa de cada transcrito dos Animais 1 e 2.

Fonte: (SANTOS, J.P.A, 2012)

Legenda: A. Os valores nos gráficos indicam a expressão relativa do respectivo transcrito em relação à expressão no animal 1. B. Os valores nos gráficos indicam a expressão relativa do respectivo transcrito em relação à expressão no animal 2. D0=momento pré-placebo; D2 = 48hs após placebo; D15= aplicação de placebo e 15 dias após primeiro placebo; D17 = 17 dias pós-primeiro placebo e 48 hs após segundo placebo.

No animal 3 só foram analisados 2 momentos devido este ter apresentado um considerável aumento da creatinina entre a triagem e a primeira injeção, demonstrando a necessidade de uma terapia convencional, como relatado anteriormente. Observe na Figura 21 que todos os parâmetros se encontram baixos antes e após o tratamento, exceto na expressão da PPTE-1 que aumentou para níveis muito altos após a injeção das CTTA.

Figura 21 - Análise da Expressão Relativa de cada transcrito do Animal 3.

Fonte: (SANTOS, J.P.A, 2012)

Legenda: A. Os valores nos gráficos indicam a expressão relativa do respectivo transcrito em relação à expressão no animal 3 D0=momento pré-placebo; D2 = 48hs após placebo; D15= aplicação de placebo e 15 dias após primeiro placebo; D17 = 17 dias pós-primeiro placebo e 48 hs após segundo placebo.

Na Figura 22A representa os valores obtidos com o animal 4 antes e após as duas injeções de CTTA, onde podemos observar que apenas a IL6 estava em níveis elevados e ainda teve um aumento após 48 h da injeção, enquanto que os outros parâmetros apresentaram valores muito baixos e não mostraram diferenças entre os parâmetros analisados.

Em relação ao animal 5 (Figura 22B) observamos o aumento da expressão de IL10 após a segunda injeção de CTTA (D17) e aumento pequeno e progressivo da IL1 β . Além disso, vimos que a expressão de IL6 aumentou após a 1ª injeção de

células e diminui após 15 dias e manteve valores baixos. O TNF α apresentou uma discreta diminuição em relação a DO. A PPTE-1 teve um leve aumento após a 1^o injeção celular, com diminuição progressiva após 15 dias de injeção e quase não foi expressa após a 2^o injeção celular.

Figura 22- Análise da Expressão Relativa de cada transcrito dos Animais 4 e 5.

Fonte: (SANTOS, J.P.A, 2012)

Legenda: Os valores nos gráficos indicam a expressão relativa do respectivo transcrito em relação à expressão no animal 5. D0=momento pré-placebo; D2 = 48hs após placebo; D15= aplicação de placebo e 15 dias após primeiro placebo; D17 = 17 dias pós-primeiro placebo e 48 hs após segundo placebo.

De acordo com os resultados estatísticos não houve diferenças entre os grupos em todas as citocinas avaliadas. As duas únicas significâncias estatísticas se deram na avaliação da IL10 que diminuiu significativamente no grupo placebo e a IL6 aumentou significativamente também no grupo placebo.

7 DISCUSSÃO

A terapia celular utilizando células-tronco de diferentes fontes tem sido explorada em diversos estudos como alternativa terapêutica para o tratamento de diversas doenças cujo tratamento ainda não é eficiente (TOGEL , 2005; ZHANG , 2006; LI , 2006; SEMEDO , 2007; WAN , 2008; IKEGAME , 2011; VILLANUEVA , 2011).

Em particular, na doença renal aguda e crônica, diversos trabalhos demonstram, que em modelos da doença em camundongos e em ratos, que a utilização destas células promove a melhora dos resultados dos exames que indicam alteração e lesão renal tanto por via endovenosa, arterial e parenquimatosa (TOGEL, 2005; SEMEDO 2007, VILLANUEVA , 2011).

A doença renal crônica é muito frequente em gatos, principalmente nos que estão em idade mais avançada e no momento, os tratamentos que se utilizam para esta doença não previnem a sua progressão, apenas melhoram a sobrevida do animal (POLZIN 1997).

No presente estudo isolamos e caracterizamos células-tronco do tecido adiposo provenientes de gatas e utilizamos estas células como fonte na terapia celular visando analisar os possíveis efeitos parácrinos destas células em gatos com doença renal crônica.

A escolha deste tecido para a obtenção das células-tronco foi feita com base em algumas características como a de ser coletado em grandes quantidades em procedimentos cirúrgicos e também por ter demonstrado potencial terapêutico eficiente na DRC (SEMEDO et al., 2009).

Neste trabalho não realizamos o transplante autólogo, uma vez que a retirada do tecido adiposo implicaria em um procedimento cirúrgico o que não seria interessante realizar tal procedimento em gatos doentes. Porém a escolha em obter as células da mesma espécie foi baseada no fato de minimizar possíveis rejeições, apesar de alguns estudos demonstrarem que células-tronco mesenquimais têm características imunomodulatórias e não causam rejeição mesmo quando injetadas em outras espécies (CAPLAN, 2009).

Nos animais que coletamos o tecido adiposo, realizamos testes de triagem ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sobert Assay*) com amostras de sangue para diagnosticar FIV e FELV, como recomenda a Associação Americana de Cuidadores de Felinos (*American Association of Feline Practioners*). O teste ELISA é um teste imunoenzimático, sensível e específico, porém ainda pode resultar em falso-positivo e falso-negativo e, por esse motivo, os resultados obtidos neste projeto foram interpretados com cautela.

Convém ressaltar que o falso-positivo, no caso do FIV, pode ocorrer devido a presença de anticorpos maternos em filhotes de até aproximadamente 6-8 meses de idade (SELLON, 2006) e o falso-negativo pode ocorrer na fase final da infecção por debilidade do sistema imunológico (HARTMANN, 2005).

Nos animais em que foi possível coletar o sangue, o teste ELISA foi realizado e os resultados de todas as coletas realizadas foram negativos.

Ainda, no caso da FIV descartamos a possibilidade de falso-negativo, pois para que isso pudesse ter ocorrido, os animais já estão bem debilitados e seu sistema imune está no falho. Além disso, neste trabalho, todas as amostras foram coletadas de animais submetidos a processo cirúrgico de eleição, ou seja, saudáveis.

Já no caso do FELV, o falso-negativo pode ocorrer nos animais que não possuem vírus circulante, mas apresentam o vírus armazenado na medula óssea.

Após os resultados do FIV e FELV, as células foram expandidas e armazenadas. Sendo que amostra G2 foi utilizada nos protocolos de Terapia Celular deste projeto.

De acordo com o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e dos Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) para afirmar que uma célula-tronco é mesenquimal é preciso que ela tenha as seguintes características: aderência ao plástico quando mantidas em cultura; expressão de CD105, CD73 e CD90, não expressar os marcadores CD45; CD34; CD14 ou CD1b, CD79a ou CD19 e HLA-DR e diferenciar em osteoblasto, adipócitos e condroblastos *in vitro*.

Visando a caracterização destas células como sendo células-tronco mesenquimais, analisamos a expressão de marcadores de pluripotência e mesenquimais por citometria de fluxo.

Na análise da expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais utilizando anticorpos humanos em citometria de fluxo observamos que as células apresentaram-se positivas para CD90 e negativas para CD45, CD34 e HLA-DR como era esperado. Não houve detecção dos marcadores CD73 e CD105 utilizando anticorpos humanos, diferentemente do que era esperado e um dos fatores que podemos pensar é que o fato do anticorpo não ser específico de gatos não podemos afirmar que as células não expressam estes marcadores ou se apenas estes anticorpos não reconheçam estes epitopos. Isto é um dos maiores problemas que os pesquisadores enfrentam quando não utilizam modelos experimentais de camundongos ou não trabalhem com humanos.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração quando se caracteriza CTM é a análise funcional das células, ou seja, sua capacidade de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos e como relatado em nosso trabalho estas células apresentaram esta capacidade de diferenciação. Este resultado é de suma importância, pois células que não tenham características de células-tronco não tem capacidade de diferenciação. Com isso, neste trabalho podemos sugerir que as CTTA isoladas neste trabalho são CTM mesmo não expressando os marcadores padrões por citometria de fluxo.

Além disso, quando analisamos o potencial proliferativo destas células pelo ensaio colorimétrico de MTT, observamos estabilidade do crescimento celular com diminuição de crescimento após 10 dias de análise o que é característico de CTM.

Diante deste resultado e comparado com outras células-tronco, o tempo de vida destas células e, portanto a caracterização destas células bem como sua utilização deve ser feita quando em passagens baixas, preferencialmente antes da passagem 10 (P10), porém não se recomenda a utilização em passagens muito baixas como P1 ou P2 devido às células ainda apresentarem populações mistas ou contaminações com outros tipos celulares.

Em relação aos resultados do teste do potencial carcinogênico, pode-se sugerir que estas células não possuem potencial carcinogênico tanto através de análises macro como microscópicas dos tecidos dos animais após 60 dias da injeção destas células em camundongos imunossuprimidos nudes. E assim, após estes resultados, as células puderam ser utilizadas para Terapia Celular.

Para a injeção de células, a via endovenosa foi escolhida com o intuito de ser utilizada rotineiramente, caso a terapia se mostre vantajosa para estes animais e também pelo fato das CTM possuírem quimiotaxia para a região de lesão e terem capacidade de atuarem de forma pácrina. Descartou-se ainda a utilização da via intraparênquimatosa, pois, seriam necessários transplantes sucessivos o que significaria sedações frequentes e estes animais não estariam em condições clínicas de realizar tais procedimentos devido à doença, assim como relatado por Quimby et al. (2011) que realizou aplicação única em no parênquima renal.

Além disso, neste estudo visamos analisar a contribuição de exames complementares laboratoriais tais como: creatinina, hemograma, urinálise; avaliação de citocinas séricas por PCR em tempo real, na evolução terapêutica dos gatos tratados.

Como este trabalho utiliza animais de companhia, algumas avaliações não foram possíveis de serem realizadas como, por exemplo, a avaliação histológica, extensivamente utilizada nos estudos com células-tronco em animais de laboratório. Essa avaliação só poderá ser realizada caso o animal fosse a óbito ou então com autorização do proprietário para a realização do procedimento de biópsia guiada por ultrassonografia, o que na maioria das vezes não é indicado para estes animais, uma vez que, para a realização deste procedimento uma vez que é necessário anestesiá-lo o animal. Portanto, neste trabalho optamos por realizar o maior número de exames viáveis que auxiliassem no acompanhamento da evolução clínica do animal e consequentemente na avaliação da resposta ao tratamento.

Através do processo de triagem dos animais podemos afirmar que para caracterizar a doença renal é realmente necessária a realização conjunta de exames de imagem, de urina (densidade urinária e razão proteína/creatinina urinária) e creatinina sérica, pois constatamos que alguns animais apresentaram aumento de creatinina e alteração no exame ultrassonográfico, porém a densidade urinária apresentava valores normais. De acordo com WATSON (1998), quando a urina se apresenta concentrada adequadamente é improvável que seja doente renal, porém não é impossível, pois em alguns casos mesmo com a perda de 2/3 dos néfrons a função renal pode estar presente. Além disso, caso ainda não haja um comprometimento tubular importante, teoricamente é possível obtermos urina com a densidade alta (OSBORNE, 1972).

Outro fator importante a ser discutido é que um número maior de machos puderam ser inseridos no estudo. Este dado está de acordo com LEFEBVRE (2011), onde diz que o sexo no gato é um fator de risco para desenvolver a doença renal e que os machos têm maior probabilidade de desenvolver a doença mais cedo que as fêmeas. Um estudo realizado com 184 gatos com DRC constatou que a média da idade dos machos foi de 10 anos, enquanto que nas fêmeas foi de 15 anos (WHITE, 2006)

Inicialmente este trabalho tinha como objetivo avaliar a aplicação de células-tronco em animais já diagnosticados com DRC e que estivesse em tratamento, porém com o decorrer dos experimentos verificamos que os animais que puderam ser incluídos já apresentavam um nível avançado da doença, apresentando alterações tanto nos exames de sangue, quanto de urina e ultrassonografia e ainda apresentando quadros eméticos frequentes, sendo imprescindível realizar o tratamento convencional com reposição hídrica. E o mais agravante é que neste período somente 8 animais foram encontrados e apenas 2 puderam participar do estudo devido a ocorrência de óbito do restante.

A partir destas dificuldades encontradas decidimos realizar a terapia celular em gatos que aparentemente não apresentassem alterações clínicas, estivessem nos estágios iniciais ou já apresentavam diagnóstico, porém estavam com o quadro da doença estável, sem a necessidade de intervenções. Portanto, iniciamos o processo de triagem, realizando exames complementares em gatos acima de 7 anos e de 89 animais pudemos incluir apenas 4, totalizando no estudo 6 animais, sendo um deles participou primeiro do grupo A e, posteriormente a proprietária aceitou a incluí-lo no grupo B.

O número restrito de animais pode ter sido um fator importante para não obtermos resultados estatísticos significativos entre grupos que realizaram terapia celular e o grupo placebo, pois pode haver uma variância individual muito grande.

Neste estudo os animais que receberam o tratamento com células-tronco não apresentaram nenhum efeito adverso, mostrando ser uma fonte celular aplicável e a via de inoculação viável. Além disso, consideramos que o transplante alogênico possui maior aplicabilidade do que o autólogo no caso desta doença, pois para

realizar este último seria necessária a sedação e este procedimento poderia prejudicar o animal portador da DRC.

Em relação à evidência de proteinúria, neste trabalho verificamos que o animal 2 do grupo placebo e os animais 3 e 5 do grupo da terapia celular apresentaram, de acordo com a IRIS, valores limítrofes. Porém de acordo com Grauer (2007), os valores encontrados nesses animais são considerados como não proteinúricos. No final do experimento nenhum destes animais apresentavam proteinúria, tanto de acordo com a IRIS, como com Grauer (2007).

Com esses resultados podemos ter 2 interpretações, sendo que uma delas é de que os animais não eram proteinúricos verdadeiramente, pois quando há valores limítrofes é necessário repetir os exames com intervalo de pelo menos 2 semanas para a confirmação, e neste caso, os exames foram repetidos após 30 dias e não foi identificada proteinúria e de acordo com Polzin (2007), a prevalência de proteinúria de origem tubular é comumente encontrada em cães e em humanos, ao contrário dos gatos. A outra interpretação é de que houve a progressão do quadro dos animais, pois a diminuição da razão proteína/creatinina associada ao aumento de creatinina pode indicar perda de néfrons como consequência menor perda de proteína pela urina (LEES, 2005). No entanto, para considerar que o quadro está evoluindo, acreditamos que os outros parâmetros deveriam estar alterados, como por exemplo, a densidade urinária e o hematócrito. No caso do hematócrito não há evidências de estarem abaixo dos valores de referências em todos os animais e a densidade está baixa somente no animal 3, portanto poderíamos considerar uma progressão somente deste animal, já que o animal 5 apresentou a densidade dentro do limite da normalidade.

Em relação às avaliações da citocinas podemos observar que as expressões de TNF α , IL1 β e IL6, que possuem atividade inflamatória, apresentaram resultados bem variáveis entre elas. O TNF α apresentou baixa expressão em todos os momentos de todos os grupos e a IL1 β aumentou, porém não de forma significativa, em dois animais, um do grupo A e um do B. Enquanto que a IL6 apresentou um momento de pico em todos os animais, exceto o animal 3, e no último exame os valores haviam diminuído drasticamente em todos. Porém no grupo A as variações de IL6 foram consideradas significativas, ou seja, houve um aumento significativo e

isto não ocorreu com o grupo B. Com isso podemos sugerir que neste estudo, os animais que receberam células-tronco não apresentaram aumento da resposta inflamatória significativa e não houve progressão da doença considerando esses resultados.

Quanto à análise da expressão da IL10, verificamos que não há diferença entre os grupos, porém dentro do grupo A sua diminuição foi significativa, ou seja, essa citocina que possui atividade antiinflamatória apresentou diminuição no grupo placebo. No grupo da terapia, o animal 5 apresentou discreto aumento da expressão de IL10, indicando que houve uma resposta imunomodulatória.

A PPET apresentou aumento considerável somente no animal 2 e 3, lembrando que este é o mesmo animal, podemos considerar que este aumento pode ser devido a uma variação individual. Nos demais animais as expressões aumentaram discretamente e somando a informação que o animal 2 apresentou elevada expressão em D0, reforça a hipótese dessa variação. Esta citocina pode estar associada a uma vasoconstrição, pois sua produção é estimulada pela angiotensina II e hipóxia (METCALF, 2007), portanto podemos sugerir que animal tenha apresentado picos de hipertensão.

Neste estudo, os possíveis efeitos das CTTA foram limitados quando considerado os resultados de hemograma, urinálise, razão proteína/creatinina e citocinas séricas, pois apesar de identificarmos uma discreta redução da creatinina em 2 animais e aumento da expressão da IL10 no último exame de um dos animais, esses resultados não apresentaram diferença significativa.

Até hoje existem poucos estudos utilizando as CTM em modelos de doença renal crônica. Em 2009, Semedo et al. mostraram em modelos 5/6 de ratos, que 3 aplicações de CTM por via endovenosa, com intervalo de 15 dias, promove uma melhora dos níveis séricos de creatinina, com redução da área fibrótica e glomeruloesclerose. Entretanto, Choi et al. (2009) utilizando o mesmo modelo animal, aplicou dose única de CTM por via endovenosa e verificou melhora somente através da diminuição da proteinúria, pois o nível sérico de creatinina aumentou ao longo do tempo e ainda de acordo com este autor a diminuição da proteinúria ocorreu pela superexpressão de VEGF.

Os modelos estudados tanto na doença renal crônica como aguda, apresentam proteinúria como consequência de uma lesão glomerular. DiBartola et al. (1987) mostraram que mais de 50% das lesões renais em gatos são de origem tubulointersticial. Portanto, como os animais deste projeto não apresentaram proteinúria marcante, sugerimos que provavelmente possuíam lesão tubulointersticial, sendo assim podemos questionar se as CTM poderiam atuar melhor em lesões glomerulares do que em lesões intersticiais, já que muitos trabalhos mostram melhora dos padrões bioquímicos em modelos roedores com lesão glomerular.

Ainda é necessário mais estudos para analisar as respostas promovidas pelas CTM na DRC, principalmente em outros modelos animais, além de roedores, pois cada espécie pode responder de forma diferente e não necessariamente podemos considerar que os resultados obtidos em um modelo devem ser esperados em outro. Além disso, quando se trata de pesquisa com animais de companhia, devemos levar em consideração, que provavelmente estes não estarão apresentando as mesmas alterações estruturais e nem sempre é possível caracteriza-las, pois no caso da DRC seria necessário realizar biópsia para tal fim, e a falta de algumas informações podem prejudicar as interpretações quando se trata de estudos clínicos.

8 CONCLUSÕES

1. O tecido adiposo de gatas é uma fonte de células-tronco mesenquimais de fácil obtenção, isolamento e expansão
2. As CTTA mostraram ser uma fonte celular aplicável e a via de inoculação viável
3. A resposta da aplicação de CTTA possui variação de animal para animal
4. Considerando as avaliações das citocinas $TNF\alpha$, $IL\beta$, IL6, IL10 não houve a progressão da doença nos animais tratados com CTTA

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, J. W. The anemia of inflammation malignancy: mechanisms and management. **Education Program of American Society of Hematology**. 2008: 159-165. 2008.
- AGGARWAL, S.; PITENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815-1822, 2005.
- AKERS, R. M.; DENBOW, D.M. **Anatomy & Physiology of Domestic Animals**. Iowa: Blackwell Publishing, 2008.
- ALEXANDRE, C.S.; VOLPINI, R.A.; SHIMIZU, M.H.; SANCHES, T.R.; SEMEDO, P.; JURA, V.L.; SARAIVA, N.O.; SEGURO, A.C.; ANDRADE, L. Lineage-negative bone marrow cells protect against chronic renal failure. **Stem Cells**, v. 27, n. 3, p. 682-692, 2009.
- AMADOR, S. M. S. **Doença renal crônica idiopática felina**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.
- ARAKAKI, J. M. M. Insuficiência renal aguda. **Ver Méd Hered**, v. 14, n. 1, 2003.
- BERNSTEEN, L.; GREGORY, C. R.; KYLES, A. E.; WOOLDRIDGE, J. D.; VALVERDE, C. R. Renal transplantation in cats. Clinical. **Techniques in Small Animal Practice**, v. 15, n. 1, p. 40-45, 200.
- BOBIS, S. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 44, p. 215-230, 2006.
- BOIM, M. A.; TEIXEIRA, V. P. C.; SCHOR, N. Rim e compostos vasoativos. In: ZATZ, R. **Fisiopatologia Renal**. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.
- BOYD, L. M; LANGSTON, C.; THOMPSON, K.; ZIVIN, K.; IMANISHI, M. Survival in cats with naturally occurring chronic kidney disease. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 1111-1117, 2008.
- BRAUN J. P, LEFEBVRE H. P, WATSON A.D. Creatinine in the dog: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 32, p. 162-179, 2003.
- BROWN, S.A. Management of feline chronic renal failure. *Waltham Focus*, v. 8, n. 3, p. 27-31, 1998.
- BRUCHFELD, A.; CARRERO, J. J.; QURESHI, A. R.; LINDHOLM, B.; BARANY, P.; HEIMBURGER, O.; HU, M.; LIN, X.; STENVINKEL, P.; MILLER, E. J. Elevated serum macrophage migration inhibitory factor (mif) concentrations in chronic kidney disease (ckd) are associated with markers of oxidative stress and endothelial activation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 15, p. 70-75, 2009.

CANEY, S. **Caring for a Cat With Kidney Failure**. Midlothian: Cat Professional, 2008.

CAMARGO, M. H. B.; MORAES, J. R. E; CARVALHO, M. B.; FERRARO, C. G; BORGES, V. P. Alterações morfológicas e funcionais dos rins dos cães com insuficiência renal crônica. **Arquivo Brasileiro. Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 781-787, 2006.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, p. 641–650, 1991.

CAPLAN, A. I. Why are mscs therapeutic? new data: new insight. **Journal of Pathology**, v. 217, p. 318-324, 2009.

CASSOLA, Antonio C. Atualização em fisiologia e fisiopatologia renal: Canais iônicos nas células do epitélio tubular renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 22, n. 3, p.176-180, 2000.

CHALHOUB, S.; LANGSTON, C.; EATROFF, A. Anemia of renal disease: what it is, what to do and what's new? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, p. 629–640, 2011.

CHEW, D. J.; BIBARTOLA, S. P. **Manual of small animal nephrology and urology**. New York: Churchill Livingstone Inc., 1986

CHOI,S.; PARK, M.; KIM, J.; HWANG, S.; PARK, S.; LEE, Y. The role of mesenchymal stem cells in the functional. **Stem cells and development**, v. 18, n. 3, 2009.

CROUCH, J.E. **Text-Atlas of Cat Anatomy**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1969.

D'ANDREA, F.; FRANCESCO, F.; FERRARO, G.A.; DESIDERIO, V.; TIRINO, V.; DE ROSA, A.; PAPACCIO, G. Large-scale production of human adipose tissue from stem cells: a new tool for regenerative medicine and tissue banking. **Tissue engineering**, v.14, part A, 2008.

D'ANJOU, M. Kidney and ureters. In: PENNICK, D.; D'ANJOU, M. **Atlas of animal ultrasonography**. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p.339-365.

DIBARTOLA, S. P.; RUTGERS, H. C.; ZACK, P. M.; TARR, M .J. Clinicopathologic findings associated with chronic renal disease in cats: 74 cases (1973–1984). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v 190, p. 1196–1202,1987.

DIBARTOLA, S. P. Abordagem clínica e avaliação laboratorial da doença renal. In: ETTINGER, F. **Tratado de medicina veterinária interna**. São Paulo: Manole, 2004.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

DONIZETTI-OLIVEIRA, C.; SEMEDO, P.; BURGOS-SILVA, M.; CENEDEZE, M. A.; MALHEIROS, D. M. A. C.; REIS, M. A.; PACHECO-SILVA, A.; CÂMARA, N. O. S. Adipose tissue-derived stem cell treatment prevents renal disease progression. **Cell Transplantation**, v. 21, n. 8, p. 1727-1741, 2012.

ELLIOTT, J.; BARBER, P. J. Feline chronic renal failure: clinical findings in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. **Journal Small Animal Practice**, v. 39, n. 2, p. 78-85, 1998.

FINCO, D. R. Applied physiology of the kidney. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Philadelphia: William & Wilkins, 1995.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1975.

HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection and related diseases. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of veterinary internal medicine**. Philadelphia: p. 659-662, 2005.

HYUN, Y. Y.; KIM, I. O.; KIM, M. H.; NAM, D. H.; LEE, M. H.; KIM, J. E.; SONG, H. K.; CHA, J. J.; KANG, Y. S.; LEE, J. E.; KIM, H. W.; HAN, J. Y.; CHA, D. R. Adipose-derived stem cells improve renal function in a mouse model of IgA Nephropathy. **Cell Transplantation**, 2011.

HONG, S. J.; TRAKTUEV, D. O.; MARCH, K. L. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. **Current Opinion Organ Transplant**, v. 15, p. 86-91, 2010.

HUDSON, L.C.; HAMILTON, W.P. **Atlas of Feline Anatomy for Veterinarians**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993.

IKEGAME, Y.; YAMASHITA, K.; HAYASHI, S.; MIZUNO, H.; YOU, M.F.; YAMADA, K.; TANAKA, Y.; EGASHIRA, Y.; NAKASHIMA, S.; YOSHIMURA, S.; IWAMA, T. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. **Cytotherapy**, n. 13, v. 6, p.1-11, 2011.

KING, J. N.; TASKER, S.; GUNN-MOORE, D. A.; STREHLAU, G.; GROUP, B. S. Prognostic factors in cats with chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 5, p. 906-916, 2007.

KIPAR, A.; LEUTENEGGER, C.M.; HETZELA, U.; AKENSC, M.K.; MISLIND, C.N.; REINACHERA, M.; LUTZ, H. Cytokine mRNA levels in isolated feline monocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 78, p. 305-315, 2001.

KIRPATOVSKII, V. I., KAZACHENKO, A. V.; PLOTNIKOV, E.Y. Functional aftereffects of intraparenchymatous injection of human fetal stem and progenitor cells to rats with chronic and acute renal failure. **Bull Exp Biol Med**, v. 141, p. 500, 2006

KOOY, D.; WEISS, S. Why stem cells? **Science**, v. 287, p.1439-1441, 2000.

KUWAHARA Y, OHBA Y, KITO K, Association of laboratory data and death within one month in cats with chronic renal failure. **Journal Small Animal Practice**, v. 47, p. 446–450, 2006.

LARA, V. M.; TANIWAKI, S. A.; ARAÚJO JUNIOR, J. P. Ocurrence of feline imunodeficiency vírus infection in cats. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2245-2249, 2008.

LEFEBVRE, S. Literature review – epidemiology of feline chronic kidney disease. Banfield Applied Research & Knowledge Team, 2011.

LEES, G. E.; BROWN, S. A.; ELLIOTT, J.; GRAUER, J. F.; VADEN, S. L. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 3, p. 377-385, 2005.

LI, B.; MORIOKA; T., UCHIYAMA; M. Bone marrow cell infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat model. **Kidney International**, v. 69, p. 323–330, 2006.

LIN, C. S; XIN, Z. C.; DENG, C. H.; NING, H.; LIN,G.; LUE, T. F. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. **Histol Histopathol**, v. 25, p. 807-815, 2010.

MACLEOD, L.C.; JAMES, A.W.; CARRE, A.L.; LONGAKER, M.T.; LORENZ, H.P. A Review of the Therapeutic potential of adipose-derived stem cells. **Advances in Wound Care**, v.1, 2010.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease..** Philadelphia: Saunders Company, 2005

MEIRELLES, L. S.; FONTES, M. A.; COVAS, D. T.; CAPLAN, A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 20, p. 419–427, 2009.

METCALFE, W. How does early chronic kidney disease progress? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, s. 9, 2007.

NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3499-3506, 2007.

NYLAND, T. G.; MATTON, J. S. **Veterinary diagnostic ultrasound**, Philadelphia: Saunders, 1995. 377p.

OSBORNE, C. A.; FLETCHER, T. F. Applied anatomy of the urinary system with clinicopathologic correlation. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Philadelphia: William & Wilkins, 1995.

OSBORNE, C.A.; LOW, D.G.; FINCO, D.R. **Canine and feline urology**. Philadelphia: W.B.Sauders Company, 1972.

POBER JS, COTRAN RS. Effects of cytokines on vascular endothelium: their role in vascular and immune injury. **Kidney International**, v. 35, p. 969-975, 1989.

POLZIN, D.J. What is different about chronic kidney disease in cats?. In: 2007 Nestlé Purina Nutrition Forum, 2007.

POLZIN, D. J; OSBORNE, C. A.; BARTGES, J. W.; JAMES, K. M.; CHURCHILL, J. A. insuficiência renal crônica. In: ETTINGER, S. J.; FELDMANN, S. E. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4ed. São Paulo: Manole Ltda, v.2, 1997.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; JACOB, F.; ROSS, S. Chronic renal failure. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000, v. 2, p. 1634-1662.

POLZIN, D. J. Chronic kidney disease in small animals. **Veterinary Clinical Small Animal Practice**, v. 41, p. 15–30, 2011.

PRATES, A. B.; AMARAL, F. B.; VACARO, M. Z.; GROSS, J. L.; CAMARGO, J. L.; SILVEIRO, S. P. Avaliação da filtração glomerular através da medida da cistatina c sérica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 29, n. 1, 2007.

QUIMBY, J. M.; WEBB, T. L.; GIBBONS, D.S.; DOW, S.W. Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.13, p. 418-426, 2011.

RA, J. C.; SEOB, S.; KIM, S. H.; KANG, S. K.; KANG, B. C.; LEE, H. Y.; KIM, Y. J.; JO, J. Y.; YOON, E. J.; CHOI, H. J.; KWON, E. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. **Stem Cells and Development**, 2011.

REECE, W. O. **Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals**. Ames: Wiley-Blackwell, 2009.

ROUDEBUSH, P.; POLZIN, D.J.; ROSS, S.J.; TOWELL, T.L.; ADAMS, L.G.; FORRESTER, S.D. Therapies for feline chronic kidney disease : what is the evidence? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 195, 2009.

ROSS, S. J.; OSBORNE, C. A.; KIRK, C. A.; LOWRY, S. R.; KOEHLER, L. A.; POLZIN, D. J. Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous chronic kidney disease in cats. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 229, n. 6, p. 949-957, 2006.

SAGRINATI, C.; RONCONI, E.; LAZZERI, E.; LASAGNI, L.; ROMAGNANI, P. Stem-cell approaches for kidney repair: choosing the right cells. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 7, p. 277-285, 2008.

SELLON, R.K.; HARTMANN, K. 2006. Feline immunodeficiency virus infection, p.131-143. In: GREENE, C.E., Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed., St Louis: Saunders Elsevier.

SEMEDO, P.; WANG, P. M.; ANDREUCCI, T. H. Mesenchymal stem cells ameliorate tissue damages triggered by renal ischemia and reperfusion injury. **Transplantation Proc**, v. 39, p. 421, 2007.

SEMEDO, P.; CORREA-COSTA, M.; ANTONIO, M.; MALHEIROS, M.; REIS, A.; SHIMIZU, M.H.; SEGURO, A.C.; PACHECO-SILVA, A.; SARAIVA, N.O.C. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. **Stem Cells**.v. 27, n. 12, p. 3063-73, 2009.

SEYREK-INTAS, D.; KRAMER, M. Renal imaging in cats. **Veterinary Focus**, v.18, p. 23–30, 2008.

SIGRIST, N.E. Use of dopamine in acute renal failure. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 17, n. 2, p. 117–126, 2007.

SYME, H. M.; MARKWELL, P. J., PFEIFFER, D.; ELLIOTT, J. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 528-535, 2006.

TOGEL, F.; HU, Z.; WEISS, K.; ISAAC, J.; LANGE, C.; WESTENFELDER, C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **American Journal Physiology and Renal Physiology**, v. 289: F31–F42, 2005.

UCHIDE, T.; SAIDA, K. Primary structure of cat preproendothelin-2 and cat renal mRNA expression of preproendothelin-1 and preproendothelin-2 in naturally occurring renal failure. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, p. 997-1000, 2006.

VERLANDER, J.W. Glomerular filtration. In: CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. **Textbook of veterinary physiology**. St Louis: Elsevier, 2007.

VIANNA, H.R.; SOARES, C M B M; TAVARES, M.S.; TEIXEIRA, M.M.; SILVA, A C S. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 3, p.351-364, 2011.

VIEIRA, I.O.; GRACIOLLI, F.G.; REIS, L.M.; MOYSES, R.M.; JORGETTI, V. Atualizações em nefrologia clínica: citocinas e osteodistrofia rena. **Jornal brasileiro de nefrologia**, v 23,n 34, p: 224-229, 2001.

VILLANUEVA, S.; EWERTZ, E.; CARRIÓN, F.; TAPIA, A.; VERGARA, C.; CÉSPEDES, C.; SÁEZ, P.J.; LUZ, P.; IRARRÁZABAL, C.; CARREÑO, J.E.; FIGUEROA, F.; VIO, C.P. Mesenchymal stem cell injection ameliorates chronic renal failure in a rat model. **Clinical Science**, v. 121, n. 11, p. 489-99, 2011.

WAN, C.D. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 7, p. 29-33, 2008.

WATSON, A.D.J. Urine specific gravity in practice. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 6, 1998.

WHITE, J.D.; NORRIS, J.M.; BARAL, R.M. Naturally-occurring chronic renal disease in Australian cats: a prospective study of 184 cases. **Australian Veterinary Journal**, v. 84, n. 6, p. 188-194, 2006.

YABUKI A, A.; MITANI, S.; SAWA, M.; MIZUKAMI, K.; FUJIKI, M.; YAMATO, O. A comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: Induction of cyclooxygenases. **Research in Veterinary Science**, 2011.

YEAGER, A. E.; ANDERSON, W. I. Study of association between histologic feature and echogenicity of architecturally normal cat kidney. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 860-863, 1989.

ZHANG, Q.; MADONNA, R.; SHEN, W.; PERIN, E.; ANGELI, F.S.; MURAD, F.; YEH, E.; BUJA, L.M.; DE CATERINA, R.; WILLERSON, J.T.; GENG, Y. Stem cells and cardiovascular tissue repair: Mechanism, methods, and clinical applications. **Journal of Cardiothoracic-Renal research**, v. 1, p. 3-14, 2006.

ANEXO A

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO OU RESPONSÁVEL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº
APTO:

BAIRRO: CIDADE
.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

2. NOME DO ANIMAL E/OU NÚMERO DE REGISTRO (TATUAGEM, MICROCHIP, BRINCO)

.....

ESPÉCIE:..... RAÇA:.....
PELAGEM:.....

SEXO:..... DATA DE NASCIMENTO:

DADOS SOBRE A PESQUISA

3. TÍTULO DA PESQUISA

“TERAPIA CELULAR EM GATOS PORTADORES DE DOENÇA RENAL CRÔNICA: AVALIAÇÃO
LABORATORIAL E IMAGIOLÓGICA”

PESQUISADOR: JULIANA PASSOS ALVES DOS SANTOS

CARGO/FUNÇÃO: PÓS GRADUANDA (NÍVEL DOUTORADO)

4. Departamento: DEPARTAMENTO DE CIRURGIA (VCI) Serviço: ANATOMIA DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES

5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

6. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 MESES

QUESITOS NECESSÁRIOS PARA O PREENCHIMENTO DO TCLE

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1 – OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo é avaliar o potencial da terapia celular em diminuir a progressão da doença renal crônica em gatos.

2 – DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

O procedimento para o tratamento será simples, pois as células-tronco progenitoras de tecido adiposo serão injetadas diretamente no vaso sanguíneo periférico.

3 – RELAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Seu animal será avaliado, através de exames complementares, em dois momentos: pré-tratamento e pós-tratamento. Serão realizadas coletas de amostras de sangue e de urina (cistocentese), além da realização de exames de imagem (ultrassonografia). Os exames destinados ao projeto não terão ônus ao proprietário do animal.

4 – DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS AO ANIMAL ESPERADOS NOS PROCEDIMENTOS DOS ITENS 2 E 3

As células utilizadas são derivadas do tecido adiposo e já foram testadas em camundongos imunossuprimidos quanto a sua inocuidade, tanto pelo nosso grupo de pesquisa como também por pesquisadores internacionais. Portanto, caso a terapia não resultar na melhora do animal, a doença renal crônica continuará progredindo naturalmente.

Para a realização dos exames, é necessário jejum alimentar de 12 horas e não permitir que o animal urine durante o período de 1 hora que antecede os exames.

O animal será excluído do estudo caso nos exames prévios apresente alguma doença concomitante que não esteja relacionada com a doença renal crônica, alterações renais que sejam de origem congênita ou familiar, presença de neoplasias e cálculos renais.

5 – BENEFÍCIOS PARA O PROPRIETÁRIO OU ANIMAL

Embora não aja garantia de que você terá benefícios com este estudo, é possível que ocorra melhora parcial da função renal, de acordo com dados na literatura.

Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que a terapia celular possa melhorar os valores dos marcadores de alteração renal. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

6 – GARANTIA DE ACESSO

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Mv. Ms. Juliana Passos Alves dos Santos, que pode ser encontrado no endereço: Rua Professor Orlando Marques de Paiva, número 87. Telefone: 30911311 / 86964076

7 – É GARANTIDA A LIBERDADE DA RETIRADA DE CONSENTIMENTO A QUALQUER MOMENTO E DEIXAR DE PARTICIPAR DO ESTUDO, SEM QUALQUER PREJUÍZO À CONTINUIDADE DE TRATAMENTO DO ANIMAL NA INSTITUIÇÃO

8 – DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE

As informações obtidas (relativas tanto ao proprietário quanto ao animal) serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum animal ou do proprietário;

9 – COMPROMISSO DO PESQUISADOR DE UTILIZAR OS DADOS E O MATERIAL COLETADO SOMENTE PARA ESTA PESQUISA

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Terapia celular em gatos portadores de doença renal crônica: avaliação laboratorial e imagiológica”**

Eu discuti com o MV. Ms Juliana Passos Alves dos Santos sobre a minha decisão em incluir meu(s) animal(is) nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados em meu(s) animal(is), seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Concordo voluntariamente que meu(s) animal(is) participe(m) deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu ou meu(s) animal(is) possa(m) ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do proprietário

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de proprietários analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste proprietário para a participação de seu(s) animal(is) neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

ANEXO B

Anexo 2 – Animais triados para o estudo, com dados de creatinina sérica; densidade urinária; razão proteína/creatinina urinária; ultrassonografia e a posição no estudo.

	Animal	Sexo	Creatinina sérica	Densidade urinária	Razão proteína/ creatina urinária	Ultrassonografia	Posição estudo
1	Leco	M	2,28	-	-	Cálculo em pelve	Não incluso
2	Bebê	M	6	-	-	-	Óbito
3	Mongo	M	2,08	-	-	Nódulo hepático	Não incluso
4	Motoka	M	6,85	-	-	-	Óbito
5	Mity	M	4	1008	0,17	Rim diminuído	Incluso
6	Guigui	F	8,96	-	-	-	Óbito
7	Agata	F	2,7	-	-	-	Óbito
8	Xandy	F	3,3	1020	0,15	-	Incluso
9	Rajada	F	0,95	>1040	-	-	Não incluso
10	Branca	F	0,95	>1040	-	-	Não incluso
11	Preto	M	1,05	>1040	-	-	Não incluso
12	Baby Look	M	2,05	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
13	Branca	F	1,45	-	0,23	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
14	Fofinho	M	1,65	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
15	Nicole	F	1,65	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
16	Mara	F	2,05	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
17	Frajola	F	1,65	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
18	Glorinha	F	2,35	>1040	0,09	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
19	Neve	F	2,25	>1038	0,09	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
20	Tigresa	F	3,05	>1040		Rim direito mediu 2,0 cm de comprimento	Incluso
21	Maxuel	M	1,85	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
22	Heron	M	1,85	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
23	Pamela	F	1,45	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
24	Radija	F	2,25	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso

25	Rajiv	M	2,05	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
26	Ramona	F	1,75	>1040		Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
27	Fred	M	1,75	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
28	Tigre	M	1,35	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
29	Caramelo	M	1,15	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
30	Branca	F	0,95	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
31	Cinza	M	1,45	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
32	Perneta	M	0,95	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
33	Gude	M	1,45	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
34	Cicatriz	M	1,05	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
35	Ceguinha	F	1,45	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
36	Luiz	M	2,45	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
37	Jinx	M	2,05	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
38	Michaela	F	2,45	>1040	0,07	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
39	Belinha	F	2,85	1014	0,14	Comprimento renal > 3,0 cm	Incluso
40	Tuti	F	2,85	>1040	0,06	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
41	Pingo	M	2,85	>1040	0,13	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
42	Nene	M	2,25	>1040	0,21	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
43	Emily	F	2,35	>1040	0,1	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
44	Aeion	F	1,35	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
45	Batoré	M	1,55	>1040		Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
46	G3	M		>1040		Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
47	G4	M	0,95	>1040	0,32	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
48	G5	F	1,75	>1040	0,11	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
49	G7	M	0,75	>1040	0,36	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
50	G8	M	1,75	>1040	0,27	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
51	Lilica	F		>1040		Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
52	Sifu	M	1,55	>1040		Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
53	Tander	M	1,55	>1040	0,11	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
54	Bruce	M	1,75	>1040	0,08	Comprimento	Não incluso

						renal > 3,0 cm	
55	Bianca	F	1,35	>1040	0,12	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
56	Mia	F	1,05	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
57	Tof	M	1,35	>1040	0,14	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
58	Branca	F	1,35	>1040	0,12	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
59	Mico	M	1,75	1014	0,94	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
60	Xana	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
61	Safira	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
62	Bete	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
63	Tamborzinho	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
64	Ursinha	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
65	China	F	1,15	>1040	0,14	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
66	Rachide	M	-	>1040		Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
67	Kiko	M	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
68	Dudu	M	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
69	Poli	F	-	> 1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
70	Guguinha	M	3,45	1036	0,23	Comprimento renal > 3,0 cm, rim esquerdo com aumento de ecogenicidade e perda da relação corticomedular	Incluso
71	Dengosa	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
72	Neném	M	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
73	Stephani	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
74	Sara	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
75	Meiguinha	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
76	Yasmin	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
77	Frajola	M	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
78	Schima	F	0,95	1034	0,2	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
79	Miguel	M	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
80	Rochelle	F	2,15	1018		Comprimento	Óbito

						renal > 3,0 cm	
81	Shanya	F	0,45	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
82	Channel	F	0,95	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
83	Docinho	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
84	Mimi	F	1,65	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
85	Meninão	M	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
86	Bambina	F	1,55	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
87	Huguinho	M	1,65	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
88	Sol	F	1,65	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
89	Nino	M	1,45	-	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
90	Minie	F	-	1024	0,17	Comprimento renal > 3,0 cm	Desistência
91	Brancão	M	1,55	-		Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
92	Filó	F	2,45	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
93	Gatinha	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
94	Lilica	F	-	>1040	-	Comprimento renal > 3,0 cm	Não incluso
95	Robinho	M	2,0	>1040	0,24	Rins com perda de definição corticomedular e aumento de ecogenicidade de corticais	Incluso
96	Dedé	M	2,5	-	-	Rins diminuídos com diversos cálculos	Não incluso
97	Chiquito	M	2,15	1030	0,09	Comprimento renal > 3,0 cm	Incluso

Legenda: Os valores de referências são 0,8-1,8 mg/dl para creatinina; razão proteína/creatinina urinária até 0,6; tamanho renal maior que 3,0 cm.