ATANÁSIO SERAFIM VIDANE

**Modelo clínico de uso de células-tronco mesenquimais da membrana
amniótica para o tratamento da insuficiência renal crônica em gatos**

São Paulo

2015

ATANÁSIO SERAFIM VIDANE

**Modelo clínico de uso de células-tronco mesenquimais da membrana amniótica para o
tratamento da insuficiência renal crônica em gatos**

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 a obtenção do título
de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo

2015

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.3213
FMVZ

Vidane, Atanásio Serafim

Modelo clínico de uso de células-tronco mesenquimais da membrana amniótica para o tratamento da insuficiência renal crônica em gatos / Atanásio Serafim Vidane. -- 2015.
92 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. Células-tronco. 2. Citocinas. 3. Doença renal. 4. Felinos. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Modelo clínico do uso de células tronco mesenquimais da membrana amniótica para o tratamento de insuficiência renal crônica em gatos", protocolado sob o CEUA nº 3240290115, sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Ambrosio e equipe; Atanásio Serafim Vidane** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 19/08/2015.

We certify that the proposal "Clinical trials with amniotic membrane mesenchymal stem cells for chronic kidney failure in cat model", utilizing 8 Cats (8 males), protocol number CEUA 3240290115, under the responsibility of **Carlos Eduardo Ambrosio and team; Atanásio Serafim Vidane** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 08/19/2015.

Vigência da Proposta: de 04/2013 a 12/2015

Área: **Dep. De Medicina Veterinária**

Procedência: **Proprietários que aceitem entrar no experimento.**

Espécie: **Gato**

Gênero: **Machos**

idade: **qualquer**

N: **8**

Linhagem: **qualquer**

Peso: **qualquer**

São Paulo, 19 de agosto de 2015

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: VIDANE, Atanásio Serafim

Título: Modelo clínico de uso de células-tronco mesenquimais da membrana amniótica para o tratamento da insuficiência renal crônica em gatos

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: _____

*À memória do meu Pai **Serafim Paulo Vidane**.*

*À minha esposa **Dércia Ana dos Santos Vasconcelos**.*

*Ao meu filho **Wamy Serafim Vidane**.*

À minha família.

A todos o meu amor e eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, força e saúde ao longo de toda minha vida acadêmica.

Ao PEC-PG/CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Prof. Carlos Eduardo Ambrósio, pela orientação, dedicação, paciência e principalmente pela amizade. Imensa gratidão pela sua incondicional disponibilidade e apoio, não só como orientador, mas também como grande amigo, em todos os momentos de dificuldades que passei ao longo da formação.

A Profa. Maria Angélica Miglino, por ter me concedido a oportunidade de frequentar o Doutorado no programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres – FMVZ-USP.

A todos meus colegas do grupo de pesquisa GDTI pela amizade, carinho, companheirismo e todo apoio concedido durante a realização de todas as atividades da formação.

A todos os amigos professores, funcionários e alunos da FMVZ e FZEA-USP, pela amizade e apoio que sempre me dedicaram.

Aos colegas docentes da FAVET-UEM-Moçambique em especial os Profs Mohamed Harun, Mário Elias, Custódio Bila, Bentecourt Capece, Catarina Tivane, Carmen Garrine, Laurinda Augusto, Alberto Pondja, Rosa Zimba e Júlio Come, pelo apoio concedido.

Ao pessoal da CCint em nome da Clélia Godoy e a assistência social em nome da Tânia Bartholo, pelo todo apoio e orientação para minha integração.

À minha família, sem seus incentivos, amor e carinho jamais conseguiria cumprir esta etapa da minha vida.

A todos que contribuíram para a minha formação e, em especial para a elaboração deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

*“First they ignore you,
then they laugh at you,
then they fight you,
then you win.”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

VIDANE, A. S. **Modelo clínico de uso de células-tronco mesenquimais da membrana amniótica para o tratamento da insuficiência renal crônica em gatos.** [Clinical trials with amniotic membrane mesenchymal stem cells for chronic kidney failure in cat model]. 2015. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A insuficiência renal crônica (IRC) é uma afecção clínica frequente em gatos domésticos. É caracterizada por inflamação tubulointersticial, vascular, glomerular e fibrose severa. Estudos em modelos de IRC induzida em roedores têm revelado uma redução e estabilização do quadro clínico, evidenciados pela melhora nos parâmetros de função renal e redução da inflamação e da fibrose renal. Neste estudo foi testada a segurança e o efeito do transplante alogênico intra-renal e endovenoso das células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica felina (AMSCs) em gatos acometidos pela IRC natural. As AMSCs foram isoladas de âmnio de embriões coletadas em campanhas rotineiras de castração. Dez gatos, machos e fêmeas, foram incluídos neste estudo. Um gato hígido recebeu injeção intra-renal das AMSCs guiada por ultrassom em ambos rins (5×10^5 células/rim). Nove gatos com IRC natural receberam injeção endovenosa das AMSCs (2×10^6 células x 2 tratamentos). A avaliação da evolução clínica foi baseada na mensuração dos parâmetros do hemograma, bioquímica, hemogasometria, urinálise e ultrassonografia. Foi efetuada análise de variância (ANOVA) comparar diferenças entre as fases de tratamento seguido de teste de Tukey para comparação das médias entre os grupos. Na injeção intra-renal, não houve variação nos parâmetros clínicos, porém foi necessária a sedação e anestesia geral. Foi registrado elevado estresse de manipulação e ligeira hematúria após o procedimento. Os gatos com IRC que receberam injeção endovenosa das AMSCs, registraram uma variação significativa nos parâmetros de função renal (redução dos níveis de creatinina sérica, redução da proteinúria e aumento da densidade urinária). A arquitetura e morfologia renal não teve variação com o tratamento. Conclui-se que as AMSCs felinas têm um efeito renoprotetor e melhoram a função renal em gatos acometidos pela IRC, estabilizando o quadro clínico e a progressão da doença. A injeção endovenosa das AMSCs constitui uma ferramenta importante para proporcionar boa qualidade de vida aos gatos com IRC.

Palavras-chave: Células-tronco. Citocinas. Doença renal. Felinos.

ABSTRACT

VIDANE, A. S. **Clinical trials with amniotic membrane mesenchymal stem cells for chronic kidney failure in cat model.** [Modelo clínico de uso de células-tronco mesenquimais da membrana amniótica para o tratamento da insuficiência renal crônica em gatos]. 2015. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Chronic kidney disease (CKD) is a common clinical condition in domestic cats. It is characterized by tubulointerstitial, vascular, glomerular inflammation and severe fibrosis. Studies in rodent model of induced CKD have been shown a decrease and stabilization of the clinical condition, evidenced by renal function improvement and by inflammation and renal fibrosis reduction. In this study was evaluated the safety and effect of intra-renal and intravenous infusion of allogeneic mesenchymal stem cells derived from feline amniotic membrane (AMSCs) in cats with naturally occurring CKD. The AMSCs were isolated from fetal membranes collected after routine castrations. Ten cats, male and female, were enrolled and included in this study. A healthy cat received intrarenal injection of AMSCs guided by ultrasound in both kidneys (5×10^5 cells/kidney). Nine cats with naturally CDK received intravenous injection of AMSCs (2×10^6 cells x 2 treatments). The evaluation of the clinical condition was based on the measurement of complete blood count, blood biochemistry, blood gases, urinalysis and ultrasound. Analysis of variance (ANOVA) was performed to compare differences between the phases of treatment followed by Tukey test to compare means between groups. The clinical parameters of the healthy cat (intrarenal injection) did not change, but sedation and general anesthesia was required. The number of interventions stressed the animal and he developed transient hematuria after AMSCs injection. Cats with CDK, registered a significant improvement of renal function (decrease in serum creatinine and urine protein concentrations and increase in urine specific gravity). The kidney architecture and morphology did not change with the treatment. We conclude that the feline AMSCs have a renoprotective effect and improve renal function in cats with naturally occurring CKD, stabilizing the clinical condition and disease progression. Intravenous injection of AMSCs is an important tool to provide general well-being for cats with CDK.

Keywords: Citokines. Feline. Kidney disease. Stem cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura e função dos segmentos que constituem o néfrons	21
Figura 2 - Representação esquemática da fisiopatologia da doença renal crônica.....	24
Figura 3 - Mecanismo de ação das células-tronco mesenquimais (MSCs) para reparação de tecidos.....	34
Figura 4 - Coleta e processamento de úteros grávidos de gatos domésticos para a separação do âmnio.....	39
Figura 5 - Diagrama do vetor lentiviral usado (A) e o desenho experimental do modelo de transdução lentiviral para a geração das AMCS transgênicas expressando GFP (B)	42
Figura 6 - Fotografias ilustrando o procedimento para testar a segurança de injeção intra-renal das AMSCs guiado por ultrassom (A) e a injeção endovenosa lenta das AMSCs na veia cefálica de gatos acometidos com IRC natural (B).....	46
Figura 7 - Protocolo experimental aplicado para a injeção endovenosa das AMSCs em gatos com IRC	47
Figura 8 - Fotomicrografias das células-tronco mesenquimais derivadas do âmnio felino (P0).....	53
Figura 9 - Fotomicrografias e histogramas de análise do padrão de expressão de GFP em AMSCs transgênicas usando o modelo de transdução lentiviral	54
Figura 10 - Imagens ultrassonográficas da arquitetura e morfologia renal dos animais incluídos no estudo.....	61
 Quadro 1 - Classificação dos estágios da IRC em gatos domésticos.....	 31
Quadro 2 - Descrição dos animais incluídos no estudo de transplante alogênico das AMSCs	44
 Gráfico 1 - Valores médios e respectivos erros padrão de creatinina segundo os dias de tratamento	 58
Gráfico 2 - Valores médios e respectivos erros padrão da razão proteína/creatinina urinária segundo os dias de tratamento	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros do hemograma e bioquímico do animal piloto de injeção intra-renal das AMSCs	56
Tabela 2 - Médias ($\pm$ erros padrão) do peso dos animais nas diferentes fases de acompanhamento clínico (antes e depois do tratamento) dos gatos com IRC tratados com as AMSCs	57
Tabela 3 - Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros do hemograma e leucograma nas diferentes fases de acompanhamento clínico (antes e depois do tratamento) dos gatos com IRC tratados com as AMSCs	57
Tabela 4 - Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros bioquímicos nas diferentes fases de acompanhamento clínico (antes e depois do tratamento) dos gatos com IRC tratados com as AMSCs	58
Tabela 5 - Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros da urinálise nas diferentes fases de acompanhamento clínico (antes e depois do tratamento) dos gatos com IRC tratados com as AMSCs	59
Tabela 6 - Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros hemogasométricos nas diferentes fases de acompanhamento clínico (antes e depois do tratamento) dos gatos com IRC tratados com as AMSCs	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	MORFOFISIOLOGIA RENAL DOS GATOS DOMÉSTICOS	19
2.2	CAUSAS E PREVALÊNCIA DA IRC EM GATOS DOMÉSTICOS	22
2.3	FISIOPATOLOGIA DA IRC EM GATOS	23
2.4	ABORDAGEM CLÍNICA E LABORATORIAL DA IRC	24
2.4.1	Sinais clínicos	24
2.4.2	Achados laboratoriais	27
2.4.2.1	Bioquímicos e hemogasométricos	27
2.4.2.2	Urinálise	29
2.4.2.3	Achados radiográficos e ultrassonográficos	29
2.4.2.4	Achados histopatológicos	30
2.4.3	Classificação dos estágios da IRC	30
2.5	ABORDAGEM TERAPÊUTICA DA IRC EM GATOS DOMÉSTICOS	31
2.6	CÉLULAS-TRONCO NO TRATAMENTO DA IRC	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	HIPÓTESE	36
3.2	OBJETIVO GERAL	36
3.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	CRIAÇÃO DE UM BANCO DE AMSCs	38
4.1.1	Coleta e transporte de amostras	38
4.1.2	Estabelecimento de cultivo celular	39
4.1.3	Criopreservação	40

4.1.4	Descongelamento e preparação das células para o transplante	40
4.2	GERAÇÃO DE AMSCs TRANSGÊNICAS EXPRESSANDO eGFP	41
4.3	DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS DE ESTUDO	42
4.4	MANEJO NUTRICIONAL E SANITÁRIO DOS ANIMAIS DE ESTUDO	44
4.5	INJEÇÃO INTRARRENAL DAS AMSCs	45
4.6	INJEÇÃO ENDOVENOSA DAS AMSCs	46
4.7	PROTOCOLO EXPERIMENTAL NA INJEÇÃO ENDOVENOSA DAS AMSCs	47
4.8	ANÁLISES CLÍNICAS	48
4.8.1	Exames hematológicos	48
4.8.2	Exames hemogasométricos	48
4.8.3	Exames Bioquímicos.....	49
4.8.4	Exames de Urina.....	49
4.9	EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS	49
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5	RESULTADOS	52
5.1	ESTABELECIMENTO DE CULTIVO DAS AMSCs	52
5.2	GERAÇÃO DE AMSCs TRANSGÊNICAS EXPRESSANDO eGFP	53
5.3	INJEÇÃO INTRARRENAL DAS AMSCs	55
5.4	INJEÇÃO ENDOVENOSA DAS AMSCs	56
5.4.1	Avaliação laboratorial.....	57
5.4.2	Exame ultrassonográfico	60
6	DISCUSSÃO	63
6.1	ESTABELECIMENTO DE CULTIVO CELULAR	63
6.2	GERAÇÃO DE AMSCs TRANSGÊNICAS EXPRESSANDO eGFP	64
6.3	INJEÇÃO INTRARRENAL DAS AMSCs	65
6.4	INJEÇÃO ENDOVENOSA DAS AMSCs	66

7	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXO	84

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A insuficiência renal crônica (IRC) é um problema clínico comumente registrado em gatos domésticos, responsável por uma alta taxa de mortalidade e morbidade em animais idosos. Pode ser definida como falência renal estrutural e/ou funcional de um ou ambos os rins, que persiste por longos períodos, geralmente acima de três meses de ocorrência da enfermidade (KUWAHARA et al., 2006; POLZIN, 2011). Não existe tratamento definitivo para a restauração da funcionalidade do rim em gatos com IRC. O primeiro passo para a manipulação clínica da IRC seria a identificação e tratamento da causa primária. Isso é praticamente impossível pelo fato do quadro clínico da IRC se manifestar quando mais de 75% do rim estiver comprometido. Em alguns pacientes, diversos fatores pré-reais e/ou pós-renais concorrem para complicação e aceleram a progressão do quadro da IRC (BARTGES, 2012). Por isso a manipulação e controle das desordens metabólicas e complicações secundárias que advém do comprometimento da função renal, surge como a melhor alternativa para a melhoria da qualidade de vida dos gatos acometidos. Contudo, a progressão e complicação da doença até ao estágio terminal é penoso e inevitável (ELLIOTT et al., 2000).

Desde a sua descoberta na década de 1960 (HONGBAO, 2011), as células-tronco (CTs) vem sendo amplamente estudadas e surgem como a principal ferramenta no tratamento de inúmeras enfermidades. O interesse nas CTs reside na sua capacidade de auto-renovação e diferenciação em linhagens específicas em resposta a diferentes estímulos. Acredita-se que as CTs podem-se diferenciar em células especializadas de um determinado tecido ou órgão danificado, restituindo a sua integridade estrutural e/ou funcional. Na atualidade, roedores normais e transgênicos vêm sendo intensivamente utilizados como modelos no estudo dos mecanismos envolvidos em diversas doenças crônicas e degenerativas que acometem os animais (VILLANUEVA et al., 2011) e humanos (ACQUARONE et al., 2015; KANAMARU et al., 2015), assim como em ensaios clínicos no seu tratamento. Estes resultados serviram de base para a realização de testes clínicos em modelos de doenças de ocorrência natural em animais domésticos. Apesar das restrições governamentais e a falta de regulamentação clara, a procura e o uso de terapia baseada em CTs tem registrado um grande aumento em clínicas veterinárias. Com aumento da demanda, muitos veterinários oferecem o tratamento com CTs, mesmo que não existam estudos que comprovem a sua segurança e eficácia (CYRANOSKI, 2013).

O potencial das células-tronco mesenquimais (MSCs) para o tratamento da IRC tem sido reportado em inúmeros estudos em modelos de IRC induzida em roedores (NINICHUK et al., 2006; KIRPATOVSKII et al., 2007; CAVAGLIERI et al., 2009; SEMEDO et al., 2009; LEE et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2011; VILLANUEVA et al., 2013). Estes estudos revelaram uma redução e estabilização do quadro clínico evidenciados pela melhora nos parâmetros de função renal e redução da inflamação e da fibrose renal. Quimby et al. (2011) avaliaram a aplicação intrarrenal das MSCs derivadas da medula óssea e tecido adiposo felino, e recentemente Quimby et al. (2013) e Quimby et al. (2015b) testaram a segurança e eficácia da aplicação endovenosa destas linhagens celulares em gatos acometidos naturalmente com a IRC. Os resultados destes estudos pilotos embora encorajadores foram inconclusivos e controversos. Os mecanismos através dos quais as MSCs exercem o efeito terapêutico ainda não foram elucidados. Diversos pesquisadores atribuem estes efeitos a intensa atividade parácrina, resultante da liberação de microvesículas e diversos fatores após o transplante. Por isso, a via de administração endovenosa das MSCs é considerada a via mais importante que as outras vias alternativas como injeção intra-renal (QUIMBY et al., 2011) ou subcapsular (CAVAGLIERI et al., 2009), pois possibilita a ativação dos mecanismos quimiotáticos e efeitos parácrinos que favorecem tropismo ao rim (TOGEL et al., 2005; TOGEL et al., 2007).

O presente estudo tem como objetivo estabelecer um modelo clínico para testar a aplicação das células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica (AMSCs) felina no tratamento da insuficiência renal crônica em gatos domésticos. As AMSCs são células multipotentes capazes de se diferenciar em vários tipos celulares (VIDANE et al., 2014). São também conhecidas por possuírem propriedades imunomoduladoras e potente atividade como mediadores de inflamação o que as torna mais acessíveis para transplantes alogênicos (MIHU et al., 2009; HUO; SHI; PANG, 2010; LANGE-CONSIGLIO et al., 2013; BARBONI et al., 2014). O estabelecimento deste modelo pré-clínico com células-tronco de fácil acesso e alta plasticidade, traz grandes expectativas para o tratamento da IRC, que é um grande problema na prática clínica em animais de companhia, bem como para os seres humanos visando a medicina translacional. Os carnívoros domésticos são considerados como modelo ideal para estudo de disfunções ou doenças que acometem os seres humanos, pois possuem similaridades de inúmeras desordens genética e/ou doenças crônicas e degenerativas (KERKIS et al., 2008). Além disso, eles podem ser facilmente manipulados, o que torna viável a condução de experimentos e obtenção de resultados fiáveis.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MORFOFISIOLOGIA RENAL DOS GATOS DOMÉSTICOS

Os rins dos gatos domésticos são estruturas pares com aspecto de um grão de feijão, situados na posição retroperitoneal, região sublombar da cavidade abdominal. O rim direito localiza-se mais cranialmente que o esquerdo, ventralmente aos processos transversos da primeira e quarta vértebras lombares. O rim esquerdo mais caudal situa-se ventralmente aos processos transversos da segunda e quinta vértebras lombares (KONIG; LIEBICH, 2004; DYCE, 2010).

O rim é envolvido por uma cápsula fibrosa que confere a sua proteção. Na margem medial encontra-se o hilo renal que dá acesso à entrada e saída dos vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e ureter. O parênquima renal apresenta duas regiões distintas, o córtex renal (superficial) e a medula (profunda). Ao corte transversal, o córtex revela uma cor vermelho-escura e estrias que alojam as artérias interlobulares. A medula apresenta uma zona periférica escura e uma zona central com estrias radiais denominadas pirâmides renal cujo ápice (papila renal) alcança o interior de uma expansão (cálice renal) da pelve renal. Durante a embriogênese, os lobos renais das regiões corticais e medulares se fundem formando uma estrutura única de superfície lisa (KONIG; LIEBICH, 2004). Por isso os rins dos gatos domésticos são classificados como simples, liso e unipiramidal.

O rim recebe cerca de 20% do débito cardíaco transportado pela aorta abdominal. A artéria renal é um ramo da aorta abdominal que se ramifica ao atingir o hilo renal em artérias interlobares as quais seguem nas margens das pirâmides renais até a região cortico-medular onde passam a ser chamadas de artérias arqueadas devido a sua apresentação em forma de um arco. Estas emitem um grande número de artérias interlobulares que seguem radialmente para o córtex renal. As artérias interlobulares dão origem aos vasos aferentes (arteríolas glomerulares aferentes) que penetram no glomérulo formando as alças capilares do glomérulo. Estes se reúnem para formar os vasos eferentes (arteríolas glomerulares eferentes) que se ramificam em vários capilares peritubulares. Estes capilares direcionam o sangue para as veias interlobulares, que seguem o mesmo trajeto e mesmos nomes das artérias. Algumas artérias interlobulares emitem as artérias estreladas que nutrem a cápsula renal. Os gatos

apresentam uma rede venosa capsular especial, sem conexão com o restante sistema venoso que convergem em direção ao hilo renal para a veia renal (KONIG; LIEBICH, 2004).

Os rins são os principais órgãos de excreção de todas as substâncias tóxicas do organismo resultantes do metabolismo, garantindo desse modo o equilíbrio homeostático. Para além da função excretora, os rins participam na regulação do equilíbrio ácido-base (mantendo o pH extra-celular), equilíbrio eletrolítico, regulação da osmolaridade e volume dos líquidos corporais. Possui uma função endócrina participando na síntese de eritropoetina, vitamina D, aldosterona, prostaglandinas e de algumas enzimas como a renina. Pela sua influência no complexo renina-angiotensina-aldosterona os rins participam na regulação da pressão sanguínea (GUYTON; HALL, 1998).

A unidade funcional do rim é o néfron que possui diferentes estruturas que tem a finalidade de filtrar, reabsorção, secreção e ajustar a concentração final da urina. Cada néfron possui um glomérulo, túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e túbulo coletor. No glomérulo ocorre a filtração do líquido que flui dentro dos capilares e de inúmeras substâncias que constituem a urina. À exceção das proteínas, a maioria das substâncias do plasma são filtradas livremente para a cápsula de Bowman. Quando o líquido filtrado passa pelos túbulos, o seu conteúdo é modificado pela reabsorção ou secreção de água e solutos. A taxa de filtração glomerular é determinada pela pressão hidrostática ao nível da membrana capilar e pelo coeficiente de filtração (produto de da permeabilidade e área de superfície de filtração) (GUYTON; HALL, 1998).

O filtrado glomerular é quase idêntico em composição e osmolaridade ao plasma capilar. No túbulo proximal ocorre a maior reabsorção de substâncias orgânicas (glicose e aminoácidos) do filtrado bem como reabsorção dos eletrólitos (sódio e cloro). Estima-se que cerca de 70% da composição do filtrado glomerular é reabsorvido de volta ao sangue. A alça de Henle compreende o segmento descendente delgada e o segmento ascendente com porção delgada e espessa. O segmento descendente é altamente permeável à água e estima-se que cerca de 20% da água do filtrado é reabsorvido nesta secção. No segmento ascendente espesso ocorre a reabsorção ativa de cerca de 25% de sódio, cloreto e potássio do filtrado. Também se registra a reabsorção considerável de cálcio, bicarbonato e magnésio. Este segmento é praticamente impermeável à água o que é importante para o ajuste da concentração final da urina. A porção inicial do túbulo contorcido distal tem características similares ao segmento espesso da alça ascendente, sendo também denominado de segmento diluidor. A segunda porção do túbulo distal e a porção medular do túbulo coletor são responsáveis pela reabsorção de água e potássio e também pela secreção de íons de hidrogénio para o lúmen tubular. A

porção medular do tubo coletor é responsável pela reabsorção de cerca de 10% de água e sódio do filtrado. Participa também da reabsorção de ureia para o interstício tubular e secreção tubular dos íons hidrogênio contribuindo deste modo na determinação da concentração final da urina e equilíbrio ácido-base (GUYTON; HALL, 1998; BARTGES, 2012). A permeabilidade dos túbulos coletores a água é controlada pela hormona ADH (GUYTON; HALL, 1998) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura e função dos segmentos que constituem o néfrons

Fonte: (VIDANE, A. S, 2015).

Legenda: 1. Filtração glomerular: conteúdo glomerular filtrado para a cápsula de Bowman contendo várias substâncias que constituem a urina. 2. Túbulo proximal: Reabsorção de glicose, aminoácidos (100%), água (70%), sódio e cloro. 3. Segmento descendente da Alça de Henle: permeável à água. 4. Segmento ascendente da Alça de Henle: impermeável à água, ocorre a reabsorção ativa de sódio e cloro. 5. Túbulo distal: Reabsorção de água por ação da aldosterona e ADH. 6. Dutos coletores: reabsorção de água e sódio e secreção de íons de hidrogênio.

2.2 CAUSAS E PREVALÊNCIA DA IRC EM GATOS DOMÉSTICOS

A insuficiência renal crônica (IRC) é um problema comum na prática clínica de animais de companhia, sendo a maior causa de mortalidade em gatos idosos (ELLIOTT; BARBER 1998; ELLIOTT et al., 2000; LEES, 2004; SYME et al., 2006; LEFEBVRE, 2011). Embora considerada uma doença de animais idosos, a IRC pode ocorrer com frequência variada em gatos de todas as idades. Estudos retrospectivos apontam que cerca de 30% de gatos acima dos 15 anos de idade são diagnosticados com IRC (POLZINI, 2011). Em muitos pacientes, a perda funcional do rim esta intrinsecamente associada a danos estruturais, contudo, o grau de comprometimento funcional pode não refletir a perda estrutural (GALVÃO et al., 2010; BARTGES, 2012).

O termo falência renal refere-se à disfunção máxima do órgão. A doença renal crônica (DRC) é reportada quando há presença de uma lesão renal que persiste por longos períodos (meses a anos), caracterizada pela falência renal estrutural e/ou funcional definitiva e irreversível de um ou ambos os rins (KUWAHARA et al., 2006; POLZIN, 2011). A insuficiência renal crônica retrata o complexo quadro clínico que advém da perda da função renal embora mecanismos compensatórios sejam desencadeados para a manutenção da homeostase (WAKI et al., 2010).

Diversos fatores estão conotados com a origem da insuficiência renal crônica em gatos domésticos. Na sua maioria, as causas da IRC em gatos são adquiridas, frequentemente em animais idosos, contudo, podem ocorrer por causas congênitas e familiares geralmente reportados em animais jovens (LUSTOZA; KOGIKA, 2003). As causas congênitas podem ser evidenciadas de acordo com a história clínica do paciente, associado à idade do surgimento da doença e a história familiar. A IRC resultante de causas adquiridas está associada a qualquer processo patológico que cause lesão aos glomérulos, túbulos, interstício e/ou aos vasos renais (POLZIN et al., 2004; POPPL; GONZALEZ; SILVA, 2004). Em resumo, as potenciais causas das afecções renais em gatos domésticos são: desordens imunológicas (lúpus eritematoso sistêmico), inflamação ou infecção (glomerulonefrites, vasculite, pielonefrites, leptospirose, cálculo renal), neoplasias (primárias ou secundárias), amiloidose, substâncias nefrotóxicas (toxinas exógenas ou endógenas), isquemia renal, obstrução do fluxo urinário, desequilíbrio eletrolítico (hipercalcemia e hipocalemia), traumatismos e doenças congênitas e hereditárias (hipoplasia ou displasia renal, rins policísticos, nefropatias familiares diversas) (GRAUER, 2010; YABUKI et al., 2010). Em estudos retrospectivos o achado mais comum

em biopsias renais de gatos com IRC é a nefrite túbulointersticial (70,4%) e a glomerulonefrite (14,8%) (POLZIN et al., 2004). As alterações morfológicas não são específicas para a doença, os néfrons do rim acometido podem apresentar alterações que variam de atrofia severa e fibrose a hipertrofia acentuada e, portanto, os fatores responsáveis pelo desencadeamento da IRC permanecem obscuros na maioria dos gatos acometidos. Outro fenômeno que justifica a incapacidade de se identificar a causa primária da IRC é a interdependência funcional dos principais componentes do rim (glomérulos, túbulos, capilares sanguíneos e tecido intersticial), isto é, a lesão de uma das componentes leva a lesão progressiva das restantes estruturas renais inicialmente inalteradas (CHAKRABARTI et al., 2013).

2.3 FISIOPATOLOGIA DA IRC EM GATOS

As desordens que causam injúria renal culminam com uma redução considerável no número de néfrons funcionais (unidades funcionais do rim) devido a alterações patofisiológicas do glomérulo, túbulos, interstício e vasos.

Independentemente da causa primária, registra-se lesões estruturais renais irreversíveis que causam uma disfunção renal progressiva que por sua vez culmina com uma série de alterações metabólicas. Após estabelecimento da doença renal crônica, o grau de disfunção renal pode permanecer estável e declina vagarosamente por longos períodos, mesmo que o agente responsável da lesão primária não esteja presente (POLZIN et al., 2004; GALVÃO et al., 2010). Independentemente da causa, a IRC culmina com lesões progressivas e irreversíveis, e no geral, resulta no comprometimento de diferentes órgãos e sistemas (digestório, imunológico, osteomuscular, cardiovascular e nervoso) como resultado do aparecimento da síndrome urêmica.

Após a injúria renal são observadas alterações compensatórias e adaptativas como hipertrofia e hiperplasia dos néfrons na tentativa de manter um funcionamento normal do organismo. Com o decorrer do tempo, os néfrons hipertrofiados sofrem desgaste e entram em falência, não podendo mais manter o funcionamento normal do rim. Por fim, são registradas alterações destrutivas de gravidade variável como atrofia inflamação, fibrose e mineralização (Figura 2). Essas alterações morfológicas e funcionais impossibilitam a identificação

etiológica por serem comuns a diversas patologias em estagio crônico (POLZIN et al., 2004; GRAUER, 2010; LEFEBVRE, 2011).

Figura 2 - Representação esquemática da fisiopatologia da doença renal crônica

Fonte: (VIDANE, A. S, 2015).

Legenda: Após a instauração da injúria renal, ocorrem lesões progressivas dos componentes renais que culminam com redução do número de néfrons funcionais, fibrose e falência renal.

2.4 ABORDAGEM CLÍNICA E LABORATORIAL DA IRC

2.4.1 Sinais clínicos

Os sinais clínicos bem como o diagnóstico da IRC em animais domésticos variam consideravelmente de paciente para paciente (POLZIN, 2011) dependendo da natureza,

gravidade, duração, velocidade da progressão, idade, espécie e administração concomitante de medicamentos. Geralmente a doença renal não é detectada durante o seu curso, até que atinja a sua fase terminal na qual se registra nos animais afetados o desenvolvimento de um quadro clínico de insuficiência renal, caracterizada pelos sinais clínicos de azotemia. A doença renal surge como resultado de injúria ou deterioração em um/mais dos quatro principais componentes renais, glomérulos, túbulos, interstício e vasos. Estas lesões são caracterizadas por alterações morfológicas macro e microscópicas na estrutura renal. Contudo, em estágios iniciais algumas lesões apresentam apenas alterações bioquímicas e moleculares sem necessariamente apresentar alterações morfológicas renais aparentes (LEES, 2004; HABENICHT et al., 2013).

Os primeiros sinais clínicos em gatos domésticos incluem anorexia, perda de peso, perda da condição corporal, perda da massa muscular, desidratação e depressão.

A poliúria e polidipsia são as manifestações clínicas mais comuns e precoces da IRC e ocorrem como mecanismo compensatório ao desequilíbrio hidroeletrolítico. A incapacidade de concentração da urina resulta em parte da destruição dos componentes estruturais do rim bem como do comprometimento primário da responsividade renal ao hormônio ADH. Uma desproporção no aporte e na perda de fluidos pode resultar na desidratação progressiva, que é um problema comum em gatos com IRC.

A uremia é o estágio clínico mais avançado da IRC devido à incapacidade do rim em eliminar os compostos nitrogenados não proteicos que se acumulam progressivamente na circulação sanguínea. Os achados clínicos nesta fase refletem o estado urêmico do paciente com o comprometimento de diversos sistemas do organismo. Os sintomas no estado de azotemia incluem anorexia progressiva, vômitos, halitose, estomatite e gastroenterite ulcerativa (LEES, 2004; KUWAHARA et al., 2006; GALVÃO et al., 2010; GRAUER, 2010; LEFEBVRE, 2011).

As desordens gastrointestinais são relatadas com maior frequência na fase urêmica da IRC. A anorexia tem origem diversa e a sua progressão pode variar de indivíduo a indivíduo e durante as diferentes fases da IRC. A perda de peso surge como consequência direta da redução do aporte de nutrientes bem como a diversos fatores associados como vômitos, distúrbios hormonais e metabólicos. O vômito resulta da ação das toxinas urêmicas sobre a zona medular ativadora de êmese ou como consequência da gastrite urêmica ulcerativa. O aumento dos níveis de gastrina em pacientes urêmicos (GOLDSTEIN et al., 1998) resulta numa hiperacidez gástrica culminando com uma gastrite ulcerativa e hemorragia gastrointestinal. Estudos também apontam para ocorrência de disfagia e desconforto bucal

como consequência de ulcerações na mucosa bucal e na língua (ELLIOTT; BARBER, 1998; POLZIN et al., 2004).

A hipertensão arterial é também uma das complicações reportada em mais de 65% de gatos com IRC (KOBAYASHI et al., 1990). Um gato é geralmente considerado hipertenso quando a pressão sistólica excede 170mmHg e a diastólica excede 100mmHg. A hipertensão arterial esta associada ao desequilíbrio entre o débito cardíaco e a resistência vascular sistêmica. O comprometimento na excreção de água e sódio resulta em considerável acúmulo e expansão de volume de líquidos extracelulares que por sua vez influenciam os mecanismos reguladores primários da pressão sanguínea, do debito cardíaco e da resistência periférica (POLZIN et al., 2004).

As afecções neuromusculares embora atípicos em muitos casos possam estar presentes. As alterações na consciência, convulsões, ataxia e tremores estão dentre as desordens neurológicas mais registradas em gatos com IRC na fase urêmica, causadas principalmente pelo acúmulo de amônia no organismo. A amônia em altas concentrações atravessa a barreira hemato-encefálica e causa distúrbios nas células nervosas principalmente os astrócitos, resultando na disfunção neural. A produção de radicais livres (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) estão geralmente associadas à neutoxidade por amônia (BOBERMIM et al., 2015). Acredita-se também que as alterações nas bombas de cálcio decorrentes das desordens na regulação do hormônio PTH bem como a hipertensão arterial sejam os potenciais responsáveis pela manifestação neurológica da IRC. Por outro lado, a hipocalcemia e o desequilíbrio na regulação de potássio desencadeiam uma serie de desordens neuromusculares caracterizadas pela fraqueza muscular generalizada, fadiga muscular e distúrbios cardíacos (POLZIN et al., 2004).

Em alguns casos são relatados as desordens oculares que são decorrentes da hipertensão arterial. A hipertensão arterial crônica leva a uma vasoconstrição das arteríolas tendo como consequência isquemia e degeneração da retina. Em estados avançados da doença, o descolamento da retina e hemorragia na retina e órgãos vizinhos podem estar presentes (POLZIN et al., 2004).

As consequências hemorrágicas da uremia em pacientes com IRC são atribuídas em parte à perda de sangue progressiva devido à hemorragia gastrointestinal caracterizada pela hematêmese e melena, bem como pela disfunção urêmica das plaquetas, mesmo que os fatores de coagulação estejam normais (POLZIN et al., 2004).

2.4.2 Achados laboratoriais

2.4.2.1 Bioquímicos e hemogasométricos

Os achados laboratoriais bioquímicos embora característicos, não são por si suficientes para diagnóstico conclusivo da presença do quadro da IRC. O aumento de níveis séricos de ureia e creatinina, associados à hiperfosfatemia, hipocalemia, hipoalbumemia e acidose metabólica são os achados mais comuns em gatos com IRC.

A acidose metabólica é um achado comum em exames de hemogasometria nos pacientes com IRC que surge em decorrência da limitação na excreção dos íons hidrogênio devido à amoniogênese renal desordenada, diminuição na excreção de compostos fosfatados e sulfatados, transtornos nos processos de secreção tubular de íons hidrogênio e na reabsorção de bicarbonato (LEAL; LEITE JR; MAFRA, 2008). A acidose metabólica favorece para ocorrência de várias manifestações clínicas como anorexia, náuseas, vômitos. Em casos terminais pode promover a perda urinária de cálcio, favorecendo a reabsorção óssea e diminuição do débito cardíaco e fluxo sanguíneo (POLZIN et al., 2004; GALVAO et al., 2010).

A anemia é outro achado comum em gatos com IRC. Diversos fatores concorrem para a ocorrência da anemia como fragilidade eritrocitária devido à uremia, perda de sangue com a hemorragia gastrointestinal crônica, deficiência de ferro e má nutrição. Estudos também apontam como causa principal da anemia em pacientes com doença renal crônica a deficiência nos níveis de eritropoietina devido à danificação das estruturas celulares do rim e aumento da atividade proteolítica do plasma, resultando na sua baixa síntese e rápida degradação (COWGILL, 1992).

A azotemia se refere ao excesso de ureia e/ou de qualquer outro composto nitrogenado no sangue. O rim é a principal via de excreção dos produtos de catabolismo proteico. O aumento da concentração da ureia no sangue pode ser decorrente da redução da taxa de filtração glomerular. Todavia, a mensuração da ureia sanguínea não é medida eficaz para avaliação da função renal, pois pode ser influenciada por vários fatores extra-renais como, dieta com alto teor proteico, hipovolemia, hemorragia gastrointestinal e aumento do catabolismo protéico. As concentrações séricas dos níveis de creatinina são indicadores eficazes da função renal por ser eliminada quase exclusivamente por filtração glomerular e

não é reabsorvido ao nível dos túbulos. Por ser um produto da degradação não enzimática da fosfocreatinina muscular, pode ser influenciada em função da massa muscular (POLZIN et al., 2004). Apesar da secreção tubular e produção variável, a creatinina sérica é considerada o mais sensível biomarcador para medir e detectar pequenas alterações da taxa de filtração glomerular (DALTON, 2011).

A hiperfosfatemia geralmente está diretamente correlacionada às concentrações de nitrogênio uréico no sangue. O fósforo é majoritariamente excretado pelos rins e seu aumento pode estar relacionado com a diminuição da taxa de filtração glomerular. Em pacientes com IRC a hiperfosfatemia é atribuída ao aumento da atividade do paratormônio (PTH) em consequência do hiperparatireoidismo secundário. O hiperparatireoidismo é reportado em quase todos os gatos na fase final da IRC (BARBER; ELLIOTT, 1998). A origem específica do aumento da atividade da PTH é desconhecida, sendo descrita como consequência de três processos, hipocalcemia, hiperfosfatemia e diminuição da produção de calcitrol. Com a diminuição das células tubulares renais onde ocorre a reação de hidroxilação para produção de calcitrol, bem como o aumento de fosforo (que inibe a enzima hidroxilase), ocorre limitação na síntese de calcitrol. A PTH é considerada uma toxina urêmica e contribui para o surgimento de diversas manifestações clínicas reportadas na fase urêmica de pacientes acometidos. Com a diminuição dos níveis de cálcio no sangue, a PTH promove a liberação de cálcio e de fosfato dos ossos, causando a osteodistrofia renal. As manifestações deste quadro clínico incluem; fraturas patológicas, desmineralização do esqueleto, lesões ósseas e atraso no crescimento (BARBER; ELLIOTT, 1998).

A hipocalcemia é um achado comum em gatos com IRC que ocorre devido à hiperfosfatemia, diminuição de síntese de calcitrol e redução na reabsorção tubular de cálcio. Embora a hipocalcemia ocorra com maior frequência em gatos (cerca de 26%), a hipercalcemia também foi reportada em cerca de 6% dos gatos acometidos (BARBER; ELLIOTT, 1998). A hipercalcemia ionizada é um dos promotores da IRC, por isso a determinação de cálcio ionizado nestes pacientes é de extrema importância para discriminar a relação causa de causa e efeito.

Outro achado importante em análises hemogasométricas é a redução nos níveis de potássio (hipocalemia). A sua ocorrência é atribuída ao aporte deficiente, fatores dietéticos e aumento das perdas renais devido à diminuição da reabsorção tubular. As manifestações clínicas da hipocalemia incluem desordens musculares, poliúria e anorexia (POLZIN et al., 2004).

2.4.2.2 *Urinálise*

A proteinúria é o achado mais comum em exames de urina de animais com IRC. É um indicador típico da lesão glomerular, porém, discreto aumento da proteína na urina também pode estar relacionado com maior aporte proteico na dieta. Estudos apontam a existência de uma estrita relação entre as concentrações da creatinina plasmática e a magnitude da proteinúria e hipertensão arterial. A ativação do sistema renina-angiotensina que resulta na hipertensão arterial, também provoca o aumento da permeabilidade glomerular e consequente aumento da filtração de proteína plasmática. No geral, a proteinúria decorrente da IRC tem caráter progressivo e intensidade elevada, culminando com síndrome nefrótica caracterizada por hipoalbuminemia, edema, ascite, hipercolesterolemia e hipertensão (GRAUER, 2005; SYME et al., 2006).

A diminuição na densidade específica da urina é outro achado bastante importante em gatos com IRC. Estudos retrospectivos apontam que cerca de 78% dos gatos com IRC perdem a habilidade de concentrar a urina nos estágios iniciais da doença (ELLIOTT; BARBER 1998). Nestes animais também foi registrado ligeira queda no pH da urina que é atribuída a incapacidade do rim de excretar os íons de hidrogênio na sua forma tamponada.

2.4.2.3 *Achados radiográficos e ultrassonográficos*

A avaliação radiográfica e ultrassonográfica do sistema urinário tornou-se um procedimento rotineiro da medicina veterinária de pequenos animais por se tratar de métodos indolores e não invasivos e permitir a obtenção de informações precoces e importantes para o diagnóstico de doenças renais e ureterais (FEENEY; JOHNSTON, 2010; KEALY; McALLISTER; GRAHAM, 2012).

O exame radiográfico revela irregularidades no tamanho e forma dos rins bem como transtornos relacionados à calcificação e fibrose renal. A urografia excretora em gatos com IRC é um indicador importante para avaliação das anormalidades da TFG, tamanho, forma e localização dos rins. Contudo, os achados radiográficos por si não discriminam a presença ou não da DRC. O exame ultrassonográfico é de extrema importância para avaliação das alterações no parênquima e em diversas estruturas renais. Em pacientes com IRC, os rins

revelam tamanho reduzido, bordos irregulares, aumento de ecogenicidade do parênquima e perda da definição cortico-medular (CHEW; BARTHEZ, 1988; DIBARTOLA, 2004).

2.4.2.4 Achados histopatológicos

Os achados histopatológicos e citológicos de biópsias renais é que ditam a determinação do nível da lesão. A informação obtida é conclusiva e de extrema importância para a abordagem clínica do paciente e em alguns casos para a discriminação da causa e progressão da IRC (DIBARTOLA, 2004). As principais patogenias comumente descritas em animais com IRC incluem a doença policística renal, pielonefrite crônica, glomerulonefrite crônica, amiloidose renal, nefrite túbulointersticial, nefrite granulomatosa e linfossarcoma (DIBARTOLA et al., 1987; SYME et al., 2006; YABUKI et al., 2010). O arranjo histopatológico pode revelar uma combinação de perda de túbulos com substituição por fibrose e mineralização, necrose e atrofia glomerular e focos de células mononucleares (pequenos linfócito e macrófagos) no interior do interstício em associação com a fibrose intersticial (GRAUER, 2010).

2.4.3 Classificação dos estágios da IRC

De acordo com a *International Renal Interest Society* (IRIS, 2014), os estágios da evolução da IRC em cães e gatos podem ser classificados em quatro níveis (I-IV) de acordo com a concentração dos níveis séricos de creatinina, presença ou ausência de proteinúria e hipertensão arterial sistêmica. O estágio I não azotêmico (creatinina sérica <1.6mg/dl) pode ser diagnosticado em gatos com proteinúria persistente e deficiência na concentração da urina. O estágio II é caracterizado por uma ligeira azotemia e aumento progressivo dos níveis séricos de creatinina (entre 1.6-2.8mg/dl). Nos estágios I e II, as manifestações clínicas frequentes são a polidipsia e a poliúria e, alterações morfológicas podem ser detectadas no exame por imagem. O estágio III caracteriza-se pela presença de azotemia em grau moderado (creatinina sérica 2.9-5.0mg/dl). Nesta fase, as manifestações clínicas decorrentes da falência renal e uremia estão presentes. O estágio IV caracteriza-se pela intensa azotemia (creatinina

sérica > 5mg/dl) e reflete o estagio terminal da IRC. Os sinais clínicos sistêmicos da uremia (alterações gastrintestinais, neuromusculares ou cardiovasculares) exacerbam e geralmente o paciente vira óbito (Quadro 1).

Em relação à hipertensão arterial, a IRIS (2014) caracterizou valores para cães e gatos com doença renal crônica, a pressão arterial sistólica de 130 a 150mmHg de mínimo risco, de 150 a 160mmHg de baixo risco, de 160 a 180mmHg moderado risco e superior a 180mmHg de alto risco.

Quadro 1 - Classificação dos estágios da IRC em gatos domésticos

Estágio	Creatinina plasmática mg/dl	Comentários
I	< 1,6	Não azotêmico Inabilidade de concentrar a urina
II	1,6 – 2,8	Ligeira azotemia Sinais clínicos moderados
III	2,9 – 5,0	Azotemia moderada Sinais clínicos da uremia
IV	> 5,0	Azotemia intensa Sinais clínicos sistêmicos e intensos da uremia

Fonte: (IRIS, 2014).

2.5 ABORDAGEM TERAPÊUTICA DA IRC EM GATOS DOMÉSTICOS

Tratando-se de uma doença crônica associada à degeneração e morte celular e danificação estrutural irremediável, a IRC é uma doença irreversível e sem cura específica. O tratamento atualmente aplicado a pacientes com IRC visa desacelerar o curso da doença, melhorar o quadro clínico e corrigir ou controlar doenças não renais que podem afetar pacientes com IRC (BARTGES, 2012). O tratamento sintomático conservador consiste na correção dos défices e os excessos do equilíbrio hídrico, eletrolítico, ácido-básico, endócrino e nutricional. O tratamento específico consiste na redução ou reversão da progressão da doença, mediante a identificação das causas primárias da lesão renal.

O tratamento dietético é umas das alternativas mais usadas para minimizar o quadro clínico em gatos com IRC. A redução controlada da quantidade de proteínas não essenciais na dieta visando uma redução da produção de resíduos nitrogenados que provocam uremia é o procedimento mais privilegiado. É associado ao incremento de teor de calorias na dieta com

recurso a lipídios e carboidratos de modo a fornecer todos os requerimentos calóricos promovendo desta forma a redução do catabolismo, perda de peso e o acúmulo de resíduos nitrogenados (ELLIOTT et al., 2000; HUGHES et al., 2002; ROSS et al., 2006; POLZIN, 2011; BARTGES, 2012). Outras modificações nutricionais incluem diminuição ou restrição de fósforo (minimizar a hiperfosfatemia, hiperparatireoidismo), sódio (para estabilização da hipertensão arterial) aumento das vitaminas do complexo B (perdidas com a poliúria) e aumento de potássio (especialmente em gatos para correção da hipocalcemia). Estudos recentes apontam a importância do uso de fibras fermentáveis na dieta que funcionam com fonte de carboidratos para as bactérias gastrointestinais que utilizam a ureia como fonte de nitrogênio para o seu crescimento (ELLIOTT; ELLIOTT, 2009). Não existem critérios que ditam o início do tratamento dietético, sendo recomendado sempre que a IRC em gatos for detectada. Adicionalmente, deverão ser efetuadas melhorias na palatibilidade dos alimentos e/ou o uso de estimulantes do apetite dos pacientes visando o combate a anorexia.

A desidratação em consequência da poliúria é um achado comum em pacientes com IRC. Apesar do registro da polidipsia compensatória em resposta a poliúria, em muitos casos o consumo de água é insuficiente para compensar a perda excessiva. Portanto, a correção da desidratação com fluidoterapia de manutenção por via parenteral (subcutânea) é fundamental para a manutenção do equilíbrio hídrico. A quantidade e a frequência de administração variam de acordo com o estágio de progressão da IRC. A fluidoterapia parenteral também minimiza os sinais clínicos severos e alterações laboratoriais em pacientes com crise urêmica, permitindo a restauração do volume extracelular, equilíbrio eletrolítico e ácido-base (POLZIN et al., 2004).

O uso de medicamentos nefrotóxicos ou cuja eliminação é feita exclusivamente por via renal, deverão ser evitadas ou no mínimo a sua dosagem deverá ser modificada. Contudo, deverão ser feitas todas as correções necessárias em todos os parâmetros alterados no quadro clínico do paciente visando melhorar as suas condições de vida.

A hemodiálise, diálise peritoneal e transplante renal já revelaram relativa eficácia para a condução específica da DRC em humanos e em cães e gatos. Porém, em cães e gatos a sua aplicação rotineira levanta muitos desafios devido ao custo elevado, difícil acesso ao equipamento e dificuldades técnicas (POLZIN et al., 2004).

2.6 CÉLULAS-TRONCO NO TRATAMENTO DA IRC

As células-tronco são comumente definidas como células capazes de se auto-replicar mantendo seu fenótipo indiferenciado e se diferenciarem em uma ou várias linhagens específicas (HERZOG; CHAI; KRAUSE, 2003; KUIJK et al., 2011; GATTEGNO-HO; ARGYLE; ARGYLE, 2012). Acredita-se, no entanto, que a utilização de células indiferenciadas injetadas na circulação ou no local da lesão possam se diferenciar em células especializadas daquele tecido ou órgão, substituindo as células defeituosas ou destruídas e restaurar a funcionalidade bem como a integridade do tecido ou órgão. Os diferentes mecanismos pelas quais as CTs utilizam para a reparação tecidual estão ilustrados na figura 3.

Devido às inúmeras controvérsias de ordem ética e segurança para o isolamento e aplicação das células tronco embrionárias (ESC), as células tronco mesenquimais (MSC) derivadas de tecidos adultos ou fetais tem sido as mais amplamente estudadas. As MSCs derivadas da medula óssea foram por muitos anos consideradas eficazes para o tratamento de inúmeras doenças devido a sua plasticidade, contudo tem vindo a sofrer considerável depreciação devido aos procedimentos invasivos para o seu acesso bem como a heterogeneidade da sua população celular (SONCINI et al., 2007; COLLEONI et al., 2009). Portanto, a busca de novas fontes de células progenitoras, de fácil acesso e com potencial regenerativo foi o foco das atenções de muitos pesquisadores nos últimos anos.

Recentemente, a nossa equipe de pesquisa do Laboratório Grupo de Desenvolvimento de Terapias Inovadoras (GDTI-FZEA-USP), isolou e comprovou a existência da linhagem de MSCs da membrana amniótica derivada dos gatos domésticos (VIDANE et al., 2014) (ANEXO I). Estas células apresentaram características indistinguíveis das MSCs derivadas da medula óssea, previamente descritas (MARTIN et al., 2002). Em cultivo, apresentaram uma morfologia similar a dos fibroblastos e uma proliferação acelerada e indefinida sem alterações fenotípicas apreciáveis. Também foram acessíveis à criopreservação com alta viabilidade pós-congelamento, similar a das células não congeladas, o que facilita a criação de banco de células para futuras aplicações em terapia celular. A análise imunofenotípica revelou expressão de marcadores característicos de MSCs incluindo CD73, CD90 e não expressão dos marcadores específicos de células hematopoiéticas CD34, CD45 e CD79. Sob condições específicas de cultivo, foram capazes de se diferenciar em linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica. Quando inoculados em camundongos imunodeprimidos (Balbc/Nude), não foi registrada qualquer formação de teratomas nos pontos de injeção e os

animais transplantados mantiveram-se saudáveis durante todo o período experimental (VIDANE et al., 2014). Estes achados sugerem que as AMSCs de gatos domésticos representam uma fonte de células tronco bastante promissora na medicina regenerativa e terapia celular.

Acredita-se, no entanto que o uso de células multipotentes como as AMSCs, inoculados via intrarrenal ou endovenosa possam se diferenciar e repovoar as células danificadas restaurando a funcionalidade bem como a integridade renal. É nesta perspectiva que se propôs o estabelecimento de um modelo clínico para o tratamento desta doença com o uso de AMSCs de gato, que são consideradas de fácil acesso, visando contornar um dos grandes problemas que a medicina enfrenta e até então sem solução.

O modelo clínico a ser desenvolvido em gatos domésticos para tratamento da lesão renal crônica será um grande avanço da medicina regenerativa e terapia celular, e servirá de referência para tratamento de inúmeras outras doenças degenerativas que acometem os animais e igualmente os humanos.

Figura 3 - Mecanismo de ação das células-tronco mesenquimais (MSCs) para reparação de tecidos

Fonte: (VIDANE, A. S, 2015).

Legenda: As MSCs tem a capacidade de se replicar (1) e se diferenciar em linhagens especializadas (2) que podem agir diretamente na reparação de tecido lesionado. Também agem de forma parácrina/autócrina mediante a secreção de citocinas, microvesículas e exossomos (3) que carregam como mRNA, microRNA, proteínas, receptores de membrana. Estes por sua vez, estimulam, atraem e ativam diversos tipos de células progenitoras (4), células imunológicas (5), células sanguíneas (6) e células endoteliais (7), que também contribuem na reparação tecidual (8).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESE

O presente estudo foi desenhado para testar a hipótese de que as MSCs derivadas da membrana amniótica dos gatos domésticos podem melhorar a funcionalidade e a integridade do rim em gatos acometidos pela IRC, estabilizando ou revertendo o quadro clínico e a progressão da IRC.

3.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a segurança do transplante alogênico das AMSCs em gatos com IRC e testar o efeito na proteção e restauração da funcionalidade renal através da avaliação dos parâmetros da função renal e morfológicos.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e estabelecer o cultivo das células tronco mesenquimais do âmnio de gatos domésticos;
- Criar um banco de células (AMSCs);
- Identificar, diagnosticar e descrever o quadro da lesão renal crônica em gatos domésticos;
- Avaliar a segurança de transplante alogênico intrarrenal e endovenoso das AMSCs em gatos acometidos naturalmente por IRC;
- Monitorar a progressão do quadro clínico;
- Avaliar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e urinários.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos e procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os princípios de ética em investigação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) através do processo número: 3240290115.

4.1 CRIAÇÃO DE UM BANCO DE AMSCs

4.1.1 Coleta e transporte de amostras

As membranas amnióticas foram separadas de embriões com aproximadamente 30 a 35 dias de gestação, coletados em campanhas rotineiras de castração em gatos domésticos, nas clínicas da cidade de Pirassununga-SP. Apenas os úteros que eventualmente apareciam grávidos após a cirurgia eram coletados, lavados com solução tampão (PBS: “*phosphate buffering solution*”) e transportadas em caixa de isopor com gelo, a uma temperatura de aproximadamente 4⁰C até ao Laboratório de Desenvolvimento de Terapias Inovadoras (GDTI – UDCH-FZEA-USP), onde todas as etapas subsequentes foram conduzidas dentro do fluxo laminar. Os úteros foram incisados e as membranas amnióticas cuidadosamente separadas das restantes membranas fetais e acondicionados em placas de petri contendo PBS e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco by Life Technologies, NY, USA, #1662112) (Figura 4).

Figura 4 - Coleta e processamento de úteros grávidos de gatos domésticos para a separação do âmnio

Fonte: (VIDANE, A. S, 2015).

Legenda: A: úteros grávidos (*) coletados em campanhas de castração foram transportados para o laboratório sob condições de refrigeração. B: embrião envolto pela placenta zonaria (*) após a abertura dos úteros. C: as membranas fetais foram separadas e o âmnio (* membrana transparente avascular em contato com o embrião) exposto e cuidadosamente dissecado. D: embrião felino de aproximadamente 35 dias após a remoção dos envoltórios fetais.

4.1.2 Estabelecimento de cultivo celular

As membranas amnióticas foram lavadas com PBS e 1% de penicilina/estreptomicina três vezes para remoção de *debris*, muco e coágulos, em seguida manualmente maceradas em placas de petri estéreis com recurso a lâmina de bisturi. Os fragmentos macerados foram transferidos para tubos tipo falcon (15ml) e submetidos a digestão enzimática com collagenase 0,1% (w/v) (Gibco by Life Technologies, NY, USA, #1491967) durante 45 minutos a 38,5°C. Em seguida a amostra foi centrifugada a 303g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1ml de meio de cultivo: Alpha MEM (Gibco by Life Technologies, NY, USA, #1437193) suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (LGC

Biotecnologia, Brasil, #48236-FE) e 1% penicilina/estreptomicina. Em seguida o conteúdo foi transferido para uma placa de petri e cultivadas em meio Alpha MEM suplementado conforme descrito anteriormente, a 38,5°C numa atmosfera de 5% de CO₂. A reposição do meio foi efetuada a cada 24h para a remoção das células não aderentes.

Quando o cultivo atingiu uma confluência de cerca de 90% o meio de cultivo foi removido e as células desagregadas com tripsina a 0,25% (Gibco *by Life Technologies*, NY, USA), incubadas por 15 minutos a 38,5°C. Todo conteúdo da placa foi transferido para um tubo tipo Falcon e centrifugado a 303g durante 5 minutos. O pellet resultante foi ressuspensionado em 1ml do meio de cultivo, transferido para uma placa de petri e cultivadas sob mesmas condições descritas anteriormente até a terceira ou quarta passagem (P3 ou P4).

4.1.3 Criopreservação

A criopreservação celular foi efetuada na segunda e terceira passagem (P2 e P3). O cultivo foi submetido à digestão enzimática com tripsina a 0,25% e centrifugado como foi descrito anteriormente. O pellet resultante foi ressuspensionado no meio de congelamento composto por 45% de DMEM (Gibco *by Life Technologies*, NY, USA, #1481929), suplementado com 45% de SFB, 10% dimetil sulfoxido DMSO (Sigma Aldrich, Brasil, #SHBD9856V) (v/v) e 1% penicilina/estreptomicina. O conteúdo foi distribuído em criotubos, posteriormente alocados em dispositivos de criopreservação, Mr Frosty (Sigma Aldrich, Brasil), congelados por 24 horas a temperatura de -80°C. Em seguida, foram transferidos para o tanque com nitrogênio líquido no qual permaneceram armazenados e criopreservados por tempo indeterminado até a sua utilização para transplante celular.

4.1.4 Descongelamento e preparação das células para o transplante

Os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados naturalmente no fluxo laminar a temperatura ambiente. O conteúdo foi transferido para um tubo Falcon de 15ml e em seguida foi acrescentado 2ml de meio de cultivo para a inativação do DMSO. Em seguida a amostra foi centrifugada a 303g durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, o

pellet ressuspensionado em 1ml de meio de cultivo e cultivado nas mesmas condições anteriormente descritas. Após atingir a confluência de aproximadamente 90%, o cultivo foi trispinizado, centrifugado e o pellet ressuspensionado com 1ml de solução fisiológica.

A contagem celular foi efetuada em câmara de Neubauer. Após a completa homogeneização do pellet foram transferidos 10µl do conteúdo para uma câmara de Neubauer acoplada a uma lâmina. O método de coloração com azul de Trypan (1:1) foi aplicado para acessar a viabilidade celular após o congelamento. A viabilidade celular foi expressa em percentagem de células não coradas (viáveis) em relação às coradas (não viáveis).

4.2 GERAÇÃO DE AMSCs TRANSGÊNICAS EXPRESSANDO eGFP

As AMSCs foram transduzidas utilizando o sistema lentiviral para transferência gênica (Figura 5). O lentivirus utilizado possui para além da região codificadora da eGFP, uma região promotora para ubiquitina C e para os elementos de regulação pós-transcricionais. Não possui regiões de replicação o que garante maior segurança na sua manipulação. A transdução teve início com o cultivo das células 293FT (promotoras de proliferação) e transfectadas *overnight* com eGFP lentiviral na presença de lipofectamina. Depois de 48h, o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro de seringa de 45mm e suplementado com 8µg/mL brometo de hexadimetrina (Polibreno, SIGMA) que neutraliza a repulsão de cargas entre os vírus e as membranas celulares, aumentando a eficiência na transdução. Esta solução foi usada para transduzir 3×10^4 AMSCs previamente plaqueiadas em placas de seis poços, *overnight*. Três dias após a transdução, as AMSCs foram submetidas à seleção (*sorting*) em citometria de fluxo (FACS Aria and FACSDiva software, BD Bioscience) e as células positivas foram cultivadas até a sua utilização ou congelamento.

Figura 5 - Diagrama do vetor lentiviral usado (A) e o desenho experimental do modelo de transdução lentiviral para a geração das AMCS transgênicas expressando GFP (B)

Adaptado de Lois et al. (2002).

Legenda: A: diagrama do vetor lentiviral usado para a geração das AMSCs transgênicas. O plasmídeo é composto de regiões LTRs (long terminal repeated sequencens), elementos de regulação pós-transcricional (WRE), gene repórter de GFP o promotor da ubiquitina-c humano e a região codificadora da eGFP. B: desenho experimental do modelo de transdução lentiviral para a geração das AMCS transgênicas expressando GFP.

4.3 DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS DE ESTUDO

Gatos machos ou fêmeas, castrados ou inteiros, acometidos com IRC natural provenientes de diferentes unidades de atendimento veterinário da cidade de Pirassununga e arredores, foram rastreados para inclusão neste estudo. O rastreamento baseou-se em duas avaliações do perfil bioquímico realizadas num intervalo de duas semanas, e na evidencia ultrassonográfica das alterações morfológicas da IRC. Antes do procedimento, foi efetuado o levantamento da história clínica e o diagnóstico clínico por meio de exames hematológicos, hemogasométricos, bioquímicos, urinálise e ultrassonográficos para determinação do grau de lesão renal nos pacientes experimentais. Foram excluídos do experimento os animais que registrassem doenças infecciosas ou outras doenças concomitantes não decorrentes da lesão renal. A administração de terapias de suporte foi permitida desde que fosse providenciada a

garantia de não ocorrer mudanças no manejo durante o período experimental. Todos os proprietários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Um total de 27 (vinte e sete) gatos com suspeita de IRC foram submetidos ao rastreamento para inclusão no presente estudo. Dezesseis (16) animais foram excluídos por não terem apresentado alterações condizentes a IRC nos exames de triagem, um (1) animal excluído por apresentar IRC em estágio terminal e doença hepática concomitante e um (1) animal excluído por apresentar hidronefrose e obstrução do trato urinário. Um (1) animal clinicamente saudável foi usado como piloto para testar a segurança da inoculação intrarrenal das AMSCs.

A maioria dos animais foram atendidos na Unidade Didático Clínico Hospitalar FZEA/USP, Pirassununga, SP, no Hospital Veterinário Vicente Borelli da UNIFEOD, São João da Boa Vista, SP, e na Dog Shop Consultório Veterinário, Alfenas, MG. Em alguns casos mediante a dificuldade de deslocação do proprietário, alguns atendimentos eram efetuados em domicílio.

O resumo da descrição dos animais incluídos no experimento encontra-se no quadro 2 que se segue.

Quadro 2 - Descrição dos animais incluídos no estudo de transplante alogênico das AMSCs

Animal	Descrição	Ureia e Creatinina Séricas (mg/dl)	Estágio da IRC (IRIS)	Grupo	Tratamento
1	4 anos FC SRD	U 44,4 C 1,35	N/A	Saudável + AMSCs	1×10^5 AMSCs via intrarrenal de ambos rins x 1 tratamento
2	12,5 anos FC SRD	U 96,5 C 3,7	III	IRC + AMSCs	2×10^6 AMSCs Endovenoso x 2 tratamentos
3	12 anos FC SRD	U 63,5 C 2,4	II	IRC + AMSCs	2×10^6 AMSCs Endovenoso x 2 tratamentos
4	8 anos MC SRD	U 42,9 C 2,0	II	IRC + AMSCs	2×10^6 AMSCs Endovenoso x 2 tratamentos
5	11 anos FC SRD	U 55,4 C 1,85	II	IRC + AMSCs	2×10^6 AMSCs Endovenoso x 2 tratamentos
6	13 anos FC SRD	U 67,2 C 2,29	II	IRC + AMSCs	2×10^6 AMSCs Endovenoso x 2 tratamentos
7	10 anos FC SRD	U 64 C 1,61	II	IRC + AMSCs	2×10^6 AMSCs Endovenoso x 2 tratamentos
8	16 anos FC SRD	U 119,9 C 3,15	III	IRC + AMSCs	2×10^6 AMSCs Endovenoso x 2 tratamentos
9	10 anos MI SRD	U 186,9 C 3,03	III	IRC + AMSCs	2×10^6 AMSCs Endovenoso x 2 tratamentos
10	14 anos MC SRD	U 40,4 C 1,78	II	IRC + AMSCs	2×10^6 AMSCs Endovenoso x 2 tratamentos

Fonte: (VIDANE, A. S, 2015).

Legenda: FC-fêmea castrada, MC-macho castrado, MI-macho inteiro, SRD-sem raça definida.

4.4 MANEJO NUTRICIONAL E SANITÁRIO DOS ANIMAIS DE ESTUDO

O manejo sanitário e alimentar dos gatos com IRC incluídos no presente estudo era similar e com poucas especificações. A maioria dos animais tinham uma dieta com ração renal sendo na maioria da *PREMIER*, *ROYAL CANIN* e *FARMINA VET LIFE*. Três (3) animais (animal 6, 7 e 8) não tinham uma dieta específica, os proprietários reportaram que os animais não se adaptaram à dieta renal.

Antes do início da terapia celular, dois animais (animal 2 e 9) tinham histórico de fluidoterapia caseira (SC, 2 vezes por semana) associada a tratamento com FORTEKOR

(cloridrato de benazepril, 0,5mg/kg). Este tratamento foi suspenso pelo menos uma (1) semana antes do início da terapia experimental com AMSCs.

Durante o período experimental um animal apresentou graves problemas de hipersensibilidade cutânea (animal 5), caracterizado por lesões eritematosas rosadas e prurido na região auricular. O proprietário relatou que o problema era frequente neste animal e que já havia sido tratado com antifúngico (Itraconazol 30mg, 1 comp x dia), porém sem sucesso. Devido à recorrência das lesões ao longo do período experimental, foi prescrito Prednisolona 0,5mg/kg (2 vezes ao dia durante 7 dias), Cefalexina 30mg/kg (2 vezes ao dia durante 30 dias) e Clorexidina em solução aquosa 2% (1 banho a cada 3 dias durante 30 dias). O animal 4 também registrou crises de vômitos, perda de apetite e fraqueza, e foi prescrito Metocloplamida 0,5mg/kg, SC e Ranitidina 2mg/kg, SC. Nos restantes animais não houve nenhuma intervenção com tratamento de suporte, tendo se mantido todos os padrões iniciais de manejo sanitário.

4.5 INJEÇÃO INTRARRENAL DAS AMSCs

A segurança da injeção intrarrenal das AMSCs foi testada em um animal clinicamente saudável (sem nenhum histórico de problema renal).

O animal foi submetido a uma indução pré-anestésica com Metadona 0,3mg/kg, Midazolam 0,2mg/kg e Cetamina 6mg/kg, IM, seguida de uma anestesia por infusão contínua de Propofol 5mg/kg, EV. Em decúbito lateral, foi submetido a uma tricotomia na região ventral e lateral do abdômen, seguida de uma antisepsia local com álcool iodado. O gel acústico foi aplicado sobre a pele da região onde foi colocado o transdutor e os rins foram fixados manualmente para evitar a sua mobilidade. Com auxílio de ultrassom, a agulha de insulina estéril acoplada a uma seringa de 1ml a uma escala de 0,1ml foi inserida até alcançar a metade da região cortical. Cerca de 1×10^5 células diluídas em 150µl de soro fisiológico foram inoculadas lentamente em cada rim, em um único ponto de acesso, usando a técnica de mão livre (Figura 6A). Após a retirada cuidadosa da agulha foi efetuado o monitoramento em intervalos de 1h (por 5h) com ultrassom para controle de possível hemorragia e complicações pós-inoculação.

4.6 INJEÇÃO ENDOVENOSA DAS AMSCs

Este procedimento foi aplicado para todos os animais experimentais acometidos naturalmente pela IRC. A injeção intravenosa das AMSCs foi efetuada na veia cefálica após tricotomia local e assepsia. Aproximadamente 2×10^6 células (P3/P4) foram ressuspensas em 3mL de soro fisiológico e transferidos para uma seringa de 5mL acoplada a uma agulha de 22G. A veia cefálica foi acessada e canulada e em seguida procedeu-se a injeção lenta das AMSCs durante 10 minutos (Figura 6B). A administração endovenosa de solução fisiológica foi mantida por aproximadamente meia hora enquanto se efetuava o monitoramento de possíveis efeitos adversos após a injeção.

Figura 6 - Fotografias ilustrando o procedimento para testar a segurança de injeção intrarrenal das AMSCs guiado por ultrassom (A) e a injeção endovenosa lenta das AMSCs na veia cefálica de gatos acometidos com IRC natural (B)

Fonte: (VIDANE, A. S, 2015).

4.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL NA INJEÇÃO ENDOVENOSA DAS AMSCs

Foram efetuadas duas aplicações das AMSCs num intervalo de 21 dias (D0 e D21). Na primeira aplicação (D0) foi efetuado o levantamento da história clínica dos pacientes, o exame físico e a coleta de amostras de sangue para exames hematológicos, hemogasométricos e bioquímicos e amostras de urina para urinálise tipo I. Também foi efetuado o exame ultrassonográfico para avaliar a morfologia e arquitetura dos rins antes do início do tratamento. O acompanhamento da evolução clínica foi efetuado nos dias D7, D30 e D60 após a primeira aplicação. Em cada visita fez-se o levantamento da história clínica e exames de sangue e de urina. No último dia do acompanhamento clínico (D60) para além das análises laboratoriais, foi efetuado o exame ultrassonográfico para a avaliação da evolução da morfologia e arquitetura renal (Figura 7). Todos os animais do experimento terão um “*follow up*” para o acompanhamento da evolução do quadro clínico da IRC até pelo menos 1 ano após a aplicação das AMSCs.

Figura 7 - Protocolo experimental aplicado para a injeção endovenosa das AMSCs em gatos com IRC

Fonte: (VIDANE, A. S, 2015).

Legenda: D0 – dia zero, início do tratamento; D7, D21, D30 e D60: correspondem aos dias 7, 21, 30 e 60 após o início de tratamento, respectivamente.

4.8 ANÁLISES CLÍNICAS

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Unidade Didático Clínico Hospitalar da FZEA-USP. As amostras foram coletadas após jejum alimentar de oito (8) horas. As amostras de sangue e urina coletadas foram transportadas sob condições de refrigeração a 4°C. Todas as amostras foram analisadas imediatamente após a coleta à exceção das amostras coletadas fora da cidade de Pirassununga, que foram analisadas até no máximo 12h após a coleta.

4.8.1 Exames hematológicos

As amostras foram coletadas por venopunção na veia jugular externa em tubos coletores *vacutainer* contendo EDTA K2. A contagem total das hemácias, leucócitos, plaquetas, taxa de hemoglobina e o hematócrito foi efetuado utilizando um aparelho hematológico automático (BC 2800 Vet, Mindray, China). As contagens diferenciais de leucócitos e a avaliação morfológica dos elementos figurados do sangue foram feitas em esfregaços sanguíneos com coloração de Rosenfeld. Para avaliar o estado anêmico em detrimento da IRC, foi efetuada a contagem dos reticulócitos mediante a incubação durante seis minutos em temperatura ambiente de uma mistura de iguais quantidades de sangue e do corante azul de cresil brilhante (Laborclin, Brasil). Em seguida foram preparados três esfregaços e os reticulócitos foram contados em 1000 hemácias e expressos em valores absolutos (reticulócitos por μ l).

4.8.2 Exames hemogasométricos

A determinação do pH sanguíneo, pO₂ (pressão parcial de oxigênio), pCO₂ (pressão parcial do gás carbônico), níveis séricos de bicarbonato, sódio, potássio e cálcio foi efetuada em aparelhos portáteis de hemogasometria (i-STAT® System, USA) usando um kit descartáveis EG7+ ou CG8+ (Tecno4, Brasil).

4.8.3 Exames Bioquímicos

Os exames bioquímicos foram realizados para a dosagem dos níveis séricos da creatinina, ureia, proteínas totais, albumina, globulina, colesterol, fosfatase alcalina, ALT, AST, e GGT. As amostras de sangue foram coletadas em tubos com ativador de coágulo, para a obtenção do soro e as dosagens realizadas em analisador bioquímico automatizado (BS 120, Mindray, China) usando kits comerciais (Labtest, Brasil).

4.8.4 Exames de Urina

As amostras de urina foram coletas por cistocentese. A análise da urina compreendeu o exame físico, químico e a citologia do sedimento urinário. No exame físico foi analisado a cor, odor, aspecto e densidade urinária (pelo método da refratometria). No exame químico foram usadas tiras reativas colorimétricas (Labtest, Brasil) para a determinação semi-quantitativa de urobilinogênio, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina, proteína, pH e sangue oculto.

Para a análise do sedimento urinário foi realizada uma centrifugação de um volume padrão de urina (5mL) em tubo cônico graduado por 5 minutos a 100g, o sobrenadante foi descartado deixando-se cerca de 0,5mL de sedimento que foi homogeneizado. Uma gota do sedimento foi colocada numa lâmina e coberto por uma lamínula para a realização da avaliação microscópica (presença ou não de células, microrganismos, cilindros, cristais, gordura, dentre outros elementos).

As dosagens de creatinina e proteína urinária foram realizadas em analisador bioquímico automatizado (BS 120, Mindray, China) usando kits comerciais (Labtest, Brasil).

4.9 EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS

Após jejum de oito (8) horas, água *ad libitum*, os animais foram submetidos a uma tricotomia na região ventro-lateral do abdômen. Usando um transdutor de 7,5MHz, o

abdômen foi avaliado em decúbito lateral direito, lateral esquerdo e dorsal. Os rins foram cautelosamente examinados e informações referentes à posição topográfica, dimensão, forma, contornos e arquitetura interna foram colhidas. Em virtude da sua grande mobilidade, os rins foram fixados manualmente para facilitar a realização dos planos de corte de visualização (KANAYAMA, 2004; VAC, 2004).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi baseada na comparação dos valores dos achados clínicos antes e depois do tratamento em relação aos valores padrão normais para os gatos domésticos. Sendo verificadas as premissas de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias aos resultados, foi efetuada análise de variância para testar se houve diferenças entre as fases de tratamento. Para todas as variáveis foi verificada a homogeneidade de variâncias e realizado análise dos dados e dos resíduos dos valores estimados. Quando a normalidade dos resíduos não foi atendida foram excluídas as informações discrepantes (*outliers*) e repetida a análise. Quando significativa diferença foi verificada, as médias entre os grupos foram comparadas pelo teste de Tukey. Para comparação de medidas antes e depois de tratamento no procedimento de injeção intrarrenal foi considerado o teste t para dados pareados. Os resultados são apresentados como médias e erros padrão. Toda a análise estatística foi efetuada no programa *Statistical Analysis System*, versão 9.3 (SAS, 2012). Foi adotado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ESTABELECIMENTO DE CULTIVO DAS AMSCs

Após a coleta, os úteros foram abertos e as membranas fetais foram cuidadosamente separadas e o âmnio identificado por ser a membrana mais interna, transparente e avascular. Vinte e quatro horas após o cultivo inicial foi observada a presença de aglomerados celulares (Figura 8A e 8B) em pequenas colônias (*cell clusters*), aderentes à placa de cultivo. Estas células apresentaram uma morfologia fibroblastóide e uma alta taxa de proliferação caracterizada pela intensa atividade mitótica que foi comprovada pela presença de células binucleadas e pareadas (Figura 8A-8D). Estes achados sustentam o sucesso no estabelecimento da linhagem celular tipo mesenquimal da membrana amniótica dos gatos domésticos. O cultivo foi monitorado a cada 24hs e após atingirem confluência acima dos 80% foram tripsinizadas e recultivadas até a segunda ou terceira passagem (P2 ou P3), onde foram criopreservadas e/ou usadas no transplante celular. As células atingiram seu completo nível de homogeneidade na terceira passagem (P3) e mantiveram seu fenótipo bem como suas características de cultivo.

A viabilidade celular antes do congelamento foi de aproximadamente 90% porém, após a criopreservação pelo período mínimo de seis meses, registrou-se uma ligeira queda da viabilidade celular para 83%.

Figura 8 - Fotomicrografias das células-tronco mesenquimais derivadas do âmnio felino (P0)

Fonte: (VIDANE, A. S, 2014).

Legenda: Esta linhagem celular tipo mesenquimal do âmnio de gato aderiu à superfície de cultivo e apresentou uma morfologia tipo fibroblastóide (A-D) 24h após o cultivo. Foram observados agregados celulares em forma de colônias (cell clusters) (A e B). A intensa atividade mitótica é revelada pela presença de células pareadas e binucleadas (A-D). A-D: 20µm (20x).

5.2 GERAÇÃO DE AMSCs TRANSGÊNICAS EXPRESSANDO eGFP

A transdução lentiviral para a geração das AMSCs transgênicas que expressem o gene eGFP foi bem sucedida neste estudo. As células transduzidas foram analisadas em microscopia de fluorescência e emitiram fluorescência verde relativa à expressão do GFP (Figura 9B). Em análise em citometria de fluxo das AMSCs submetidas à transdução lentiviral revelaram uma expressão positiva relativa de GFP de 45,8% (Figura 9D). As células do grupo controle não revelaram expressão do gene GFP (Figura 9C). O cultivo das AMSCs submetidas à transdução lentiviral foi posteriormente submetido à separação quanto à

intensidade de fluorescência em citometria de fluxo (*sorting*), para a obtenção de linhagens puras expressando o gene GFP. Embora o *sorting* tenha sido bem sucedido, estas células demonstraram uma redução considerável na sua taxa de proliferação e dificuldades de serem mantidas em cultivo por longo período.

O procedimento foi efetuado duas vezes em células na segunda e terceira passagem (P2 e P3), recém-isoladas e criopreservadas, contudo, a dificuldade de manter o cultivo foi registrada de igual forma.

Figura 9 - Fotomicrografias e histogramas de análise do padrão de expressão de GFP em AMSCs transgênicas usando o modelo de transdução lentiviral

Fonte: (VIDANE, A. S, 2014).

Legenda: A: Fotomicrografia das AMSCs controle, não transduzidas; B: Fotomicrografia das AMSCs positivas emitindo fluorescência verde referente à expressão de GFP. C e D: Histogramas de análise em citometria de fluxo da expressão do gene GFP. As AMSCs submetidas à transdução lentiviral revelaram expressão do gene GFP (D) enquanto que as do grupo controle não revelaram marcação (C). Os histogramas representam o número relativo de células em relação à intensidade de fluorescência. A e B: 20µm (40x).

5.3 INJEÇÃO INTRARRENAL DAS AMSCs

Procedeu-se a inoculação intrarrenal bilateral das AMSCs em um animal hígido para se testar a eficiência do protocolo anestésico e a segurança do procedimento. Durante e após a aplicação, o animal foi monitorado para a avaliação de possíveis efeitos adversos. O monitoramento foi baseado no exame físico (frequência respiratória, frequência cardíaca, coloração das mucosas e desconforto abdominal). Pelo exame ultrassonográfico foi avaliada possível ocorrência de hemorragia no local da injeção.

Durante o procedimento o animal apresentou-se bastante estressado embora não tenha se observado desconforto abdominal ou renal durante a palpação. Não houve variação considerável nos parâmetros do exame físico durante e após o procedimento. No exame ultrassonográfico não foi observada ocorrência de hemorragia na região cortical dos rins onde se procedeu a inoculação das AMSCs. Porém, foi constatada a presença de pequena quantidade de sangue no conteúdo da vesícula urinária caracterizada por partículas hiperecogênicas (hemácias), não observadas antes do procedimento. Três horas após a aplicação foi constatada ligeira hematúria de curta duração e o animal não apresentava alteração clínica significativa.

O animal foi monitorado diariamente por um período de uma semana, e no D7 após a inoculação das CTs foi efetuada a coleta de amostras de sangue e urina para análises laboratoriais.

A comparação das medidas de hemograma e bioquímica sérica antes (D0) e depois da injeção (D7) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Para testar foi considerado o teste t para dados pareados. Esta observação sugere que não houve nenhum efeito colateral devido ao transplante alogênico desta linhagem celular e do procedimento (Tabela 1).

Por se tratar de um procedimento bastante delicado, foi necessária uma sedação e anestesia leve no animal. Por outro lado, para a execução deste procedimento foi necessária uma equipe grande de seis (6) pessoas, dos quais um (1) operador do ultrassom, um (1) auxiliar para realizar a punção, um (1) anestesista, um (1) cirurgião de prontidão para intervenção em caso de possível complicação e um (1) auxiliar para a contenção do animal.

Tabela 1- Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros do hemograma e bioquímico do animal piloto de injeção intrarrenal das AMSCs

Hemograma			Bioquímica		
Variável	Valor Referência	Média	Variável	Valor Referência	Média
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	5,5-19,5	$11,25 \pm 2,95$	Ureia (mg/dl)	38,6-70,1	$46,15 \pm 1,75$
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	5,4-10,7	$5,58 \pm 0,12$	Creatinina (mg/dl)	0,7-1,8	$1,23 \pm 0,12$
Hemoglobina (g/dl)	9-15	$10,00 \pm 0,4$	Proteína (g/dl)	5,7-7,9	$7,91 \pm 0,21$
Hematócrito (%)	30-47	$28,40 \pm 0,10$	Albumina (g/dl)	2,3-3,4	$2,22 \pm 0,07$
VCM (fL)	41-51	$51,00 \pm 0,90$	Globulina (g/dl)	2,6-4,5	$5,69 \pm 0,14$
HCM (pg)	13-18	$17,90 \pm 1,10$	ALT (UI/L)	30-100	$50,5 \pm 0,5$
CHCM (%)	31-35	$35,15 \pm 1,55$	AST (UI/L)	12-56	$31,5 \pm 0,5$
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	300-800	$559,50 \pm 27,5$	FA (UI/L)	15-92	$23,5 \pm 0,5$

Médias dos parâmetros antes do tratamento (D0) e sete dias após o tratamento (D7).

5.4 INJEÇÃO ENDOVENOSA DAS AMSCs

Devido aos efeitos adversos e aos riscos associados à aplicação intrarrenal das AMSCs, foi adotado neste experimento o procedimento de injeção das CTs por via endovenosa. Os animais receberam uma injeção lenta de 1×10^6 AMSCs na veia cefálica ressuspendidas em 3ml de solução fisiológica. Os animais foram monitorados por um período de pelo menos 1h após o transplante celular.

Durante e após a aplicação das AMSCs não foram registrados quaisquer efeitos adversos. Os animais mantiveram-se clinicamente estáveis e transcorridos 24 horas não foi reportado nenhum transtorno associado ao procedimento. Apenas um (1) animal apresentou êmeses durante o procedimento, porém os mesmos ocorriam mesmo antes de início do procedimento, e o proprietário relatou que cessaram após o retorno ao domicílio.

A avaliação do estado clínico geral dos animais demonstrou considerável melhoria. Os proprietários relataram melhorias na qualidade de vida dos animais no que concerne à ingestão de alimentos e comportamento social. Estes depoimentos foram sustentados com os achados do exame físico, nos quais foram registradas melhorias da condição corporal e no estado clínico geral. O peso dos animais não variou durante o tratamento (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias ($\pm$ erros padrão) do peso dos animais nas diferentes fases de acompanhamento clínico (antes e depois do tratamento) dos gatos com IRC tratados com as AMSCs

Variável	Fases de Tratamento			
	D0	D7	D30	D60
Peso (kg)	$4,01 \pm 0,37^A$	$3,93 \pm 0,35^A$	$3,91 \pm 0,34^A$	$3,90 \pm 0,32^A$

Médias em uma mesma linha para cada variável seguidas por uma mesma letra maiúscula, não diferem entre si no nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.4.1 Avaliação laboratorial

Os valores de referência (padrão de normalidade) para gatos domésticos usados para comparação com os achados clínicos foram descritos por Meyer e Harvey (2004).

Não foram observadas variações significativas nos parâmetros do hemograma nas diferentes fases de acompanhamento clínico, e estes parâmetros encontram-se dentro dos padrões normais para gatos domésticos. As plaquetas no geral estiveram abaixo dos valores recomendados para gatos e foi observado um aumento significativo sete (7) dias logo após o início de tratamento, que teve uma tendência de estabilização nos dias subsequentes (Tabela 3). Na contagem diferencial das células brancas, não houve registro de variação significativa.

Tabela 3 - Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros do hemograma e leucograma nas diferentes fases de acompanhamento clínico (antes e depois do tratamento) dos gatos com IRC tratados com as AMSCs

Variável	Valor Referência	Fases de Tratamento			
		D0	D7	D30	D60
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	5,5-19,5	$9,17 \pm 1,36^A$	$9,89 \pm 1,25^A$	$9,35 \pm 2,39^A$	$11,19 \pm 3,12^A$
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	5,4-10,7	$7,70 \pm 0,31^A$	$7,71 \pm 0,14^A$	$7,55 \pm 0,19^A$	$7,60 \pm 0,30^A$
Hemoglobina (g/dl)	9-15	$12,15 \pm 0,88^A$	$12,42 \pm 0,29^A$	$11,65 \pm 0,53^A$	$11,27 \pm 0,62^A$
Hematócrito (%)	30-47	$34,33 \pm 2,05^A$	$32,90 \pm 2,21^A$	$33,49 \pm 1,58^A$	$34,24 \pm 1,54^A$
VCM (fL)	41-51	$47,15 \pm 1,23^A$	$45,92 \pm 1,13^A$	$46,07 \pm 1,32^A$	$47,83 \pm 1,63^A$
HCM (pg)	13-18	$16,53 \pm 0,56^A$	$16,19 \pm 0,33^A$	$15,99 \pm 0,52^A$	$15,85 \pm 0,41^A$
CHCM (g/dl)	31-35	$35,14 \pm 0,69^A$	$36,09 \pm 0,58^A$	$34,77 \pm 0,58^A$	$33,96 \pm 0,82^A$
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	300-800	$111,78 \pm 23,22^B$	$171,44 \pm 25,71^A$	$147,44 \pm 26,53^{AB}$	$147,99 \pm 27,27^{AB}$
Neutrófilos Segmentados (%)	35-75	$60,22 \pm 4,61^A$	$68,00 \pm 4,62^A$	$73,00 \pm 3,87^A$	$73,83 \pm 4,09^A$
Linfócitos (%)	20-55	$19,67 \pm 3,93^A$	$18,78 \pm 3,05^A$	$19,78 \pm 2,92$	$14,71 \pm 2,85^A$

Médias em uma mesma linha para cada variável seguidas por uma mesma letra maiúscula, não diferem entre si no nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

No exame bioquímico foi observado que os valores da ureia, colesterol e da enzima AST embora sem variação significativa, mantiveram-se acima dos padrões normais para gatos domésticos. Os valores de Creatinina tiveram uma redução significativa ao longo das diferentes fases de acompanhamento clínico (p -valor = 0,0280) (Gráfico 1). A variação foi evidente logo após o início de tratamento (07 dias) e mais acentuada após a segunda aplicação das AMSCs. Os valores de albumina também registraram uma variação significativa entre o D7 e D60 (p -valor = 0,0043), porém a variação ocorre dentro dos padrões de normalidade da espécie. Os restantes parâmetros não tiveram variações apreciáveis e mantiveram-se dentro dos padrões normais (Tabela 4).

Tabela 4 - Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros bioquímicos nas diferentes fases de acompanhamento clínico (antes e depois do tratamento) dos gatos com IRC tratados com as AMSCs

Variável	Valor Referência	Fases de Tratamento			
		D0	D7	D30	D60
Ureia (mg/dl)	38,6-70,1	81,86 $\pm$ 15,59 ^A	81,69 $\pm$ 15,75 ^A	82,03 $\pm$ 14,08 ^A	82,59 $\pm$ 13,76 ^A
Creatinina (mg/dl)	0,7-1,8	2,43 $\pm$ 0,24 ^A	2,31 $\pm$ 0,24 ^{BC}	2,38 $\pm$ 0,25 ^{AB}	2,10 $\pm$ 0,25 ^C
Proteína (g/dl)	5,7-7,9	7,36 $\pm$ 0,14 ^A	7,43 $\pm$ 0,13 ^A	7,31 $\pm$ 0,16 ^A	7,46 $\pm$ 0,17 ^A
Albumina (g/dl)	2,3-3,4	2,52 $\pm$ 0,07 ^{AB}	2,62 $\pm$ 0,06 ^A	2,78 $\pm$ 0,25 ^{AB}	2,35 $\pm$ 0,10 ^B
Globulina (g/dl)	2,6-4,5	4,80 $\pm$ 0,17 ^A	4,81 $\pm$ 0,16 ^A	4,52 $\pm$ 0,38 ^A	5,14 $\pm$ 0,24 ^A
ALT (UI/L)	30-100	44,50 $\pm$ 5,08 ^A	48,12 $\pm$ 3,98 ^A	53,75 $\pm$ 5,77 ^A	51,40 $\pm$ 9,16 ^A
AST (UI/L)	12-56	35,13 $\pm$ 1,34 ^A	36,13 $\pm$ 4,67 ^A	36,63 $\pm$ 6,92 ^A	38,24 $\pm$ 4,11 ^A
FA (UI/L)	15-92	27,22 $\pm$ 2,03 ^A	26,56 $\pm$ 2,75 ^A	28,67 $\pm$ 5,26 ^A	24,64 $\pm$ 3,50 ^A
Colesterol (mg/dl)	38-186	196,10 $\pm$ 13,65 ^A	193,94 $\pm$ 11,69 ^A	193,99 $\pm$ 17,60 ^A	159,48 $\pm$ 19,10 ^A

Médias em uma mesma linha para cada variável seguidas por uma mesma letra maiúscula, não diferem entre si no nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Gráfico 1 - Valores médios e respectivos erros padrão de creatinina segundo os dias de tratamento

Fonte: (VIDANE, A. S, 2014).

Na urinálise não foram observadas variações estatisticamente significativas ao longo do tempo. Porém, a razão proteína/creatinina urinária teve uma diminuição biológica significativa, tendo atingido níveis considerados normais para a espécie (p-valor = 0.1319) (Gráfico 2). Este cenário é decorrente de uma redução gradual da perda de proteína na urina (diminuição da proteinúria) e aumento da excreção de creatinina ao longo das diferentes fases de tratamento (Tabela 5). O exame físico da urina também não revelou grandes variações ao longo de tratamento. A maioria dos animais iniciou o tratamento com urina ligeiramente transparente, porém foram demonstrando melhoria em relação à coloração.

Tabela 5 - Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros da urinálise nas diferentes fases de acompanhamento clínico (antes e depois do tratamento) dos gatos com IRC tratados com as AMSCs

Variável	Valor Referência	Fases de Tratamento			
		D0	D7	D30	D60
Densidade urinária	1,02-1,04	$1,029 \pm 0,005^A$	$1,033 \pm 0,005^A$	$1,028 \pm 0,004^A$	$1,031 \pm 0,005^A$
pH	4,5-7,0	$5,89 \pm 0,34^A$	$5,67 \pm 0,28^A$	$5,72 \pm 0,29^A$	$5,90 \pm 0,33^A$
Creatinina	...	$156,44 \pm 38,61^A$	$173,58 \pm 37,58^A$	$175,77 \pm 37,68^A$	$238,14 \pm 63,72^A$
Proteína	...	$44,77 \pm 10,33^A$	$47,91 \pm 10,43^A$	$34,32 \pm 6,57^A$	$33,95 \pm 6,73^A$
Razão P/C	<0,2	$0,28 \pm 0,05^A$	$0,25 \pm 0,04^A$	$0,25 \pm 0,06^A$	$0,2 \pm 0,06^A$

Médias em uma mesma linha para cada variável seguidas por uma mesma letra maiúscula, não diferem entre si no nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Gráfico 2 - Valores médios e respectivos erros padrão da razão proteína/creatinina urinária segundo os dias de tratamento

Fonte: (VIDANE, A. S., 2014).

Os gases e os eletrólitos sanguíneos em sua maioria não tiveram variação estatisticamente significativa e mantiveram-se dentro dos padrões normais para os gatos domésticos (Tabela 6). A variação significativa de sódio observada no D30 (p-valor = 0,0359) ocorre dentro dos padrões normais da espécie e demonstra estabilização no D60. Em contrapartida, o potássio e o cálcio ionizado mantiveram-se abaixo dos padrões de normalidade ao longo de todo o período experimental.

Tabela 6 - Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros hemogasométricos nas diferentes fases de acompanhamento clínico (antes e depois do tratamento) dos gatos com IRC tratados com as AMSCs

Variável	Valor Referência	Fases de Tratamento			
		D0	D7	D30	D60
pH	7,24-7,40	7,30 $\pm$ 0,02 ^A	7,28 $\pm$ 0,02 ^A	7,31 $\pm$ 0,02 ^A	7,28 $\pm$ 0,03 ^A
pCO ₂ (mmHg)	32,7-44,7	40,51 $\pm$ 1,69 ^A	41,70 $\pm$ 2,35 ^A	39,89 $\pm$ 3,02 ^A	42,74 $\pm$ 4,71 ^A
pO ₂ (mmHg)	47,9-56,3	40,78 $\pm$ 2,32 ^A	39,22 $\pm$ 2,41 ^A	39,22 $\pm$ 2,71 ^A	36,42 $\pm$ 1,93 ^A
BE (mmol/L)	(-9,8)-(-2)	-5,89 $\pm$ 0,56 ^A	-7,44 $\pm$ 1,14 ^A	-6,11 $\pm$ 0,56 ^A	-7,11 $\pm$ 0,73 ^A
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	17-21	20,00 $\pm$ 0,52 ^A	19,34 $\pm$ 0,92 ^A	19,90 $\pm$ 0,62 ^A	19,74 $\pm$ 0,68 ^A
TCO ₂ (mmol/L)	18-23	21,56 $\pm$ 0,56 ^A	21,02 $\pm$ 0,66 ^A	21,11 $\pm$ 0,73 ^A	21,44 $\pm$ 0,58 ^A
SO ₂ (%)	...	65,89 $\pm$ 3,02 ^A	64,22 $\pm$ 3,91 ^A	65,56 $\pm$ 3,44 ^A	59,55 $\pm$ 3,52 ^A
Na (mEq/L)	151-158	152,11 $\pm$ 0,45 ^A	151,89 $\pm$ 0,89 ^A	150,00 $\pm$ 0,85 ^B	150,57 $\pm$ 0,72 ^{AB}
K (mEq/L)	4,0-5,3	3,77 $\pm$ 0,19 ^B	3,98 $\pm$ 0,21 ^A	3,80 $\pm$ 0,25 ^{AB}	3,64 $\pm$ 0,20 ^B
iCa (mEq/L)	3,6-6,0	1,31 $\pm$ 0,03 ^A	1,31 $\pm$ 0,02 ^A	1,30 $\pm$ 0,02 ^A	1,27 $\pm$ 0,02 ^A

Médias em uma mesma linha para cada variável seguidas por uma mesma letra maiúscula, não diferem entre si no nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.4.2 Exame ultrassonográfico

Ao exame ultrassonográfico não foram observadas alterações na arquitetura e morfologia dos rins acometidos, 60 dias após o início do tratamento. No geral houve manutenção de todos os padrões morfológicos e estruturais iniciais. Na figura 10 estão ilustradas as imagens ultrassonográficas dos rins dos animais experimentais. O grau de acometimento era na maioria similar para ambos os rins, em especial os animais no estágio III da insuficiência renal crônica, segundo a IRIS. Alguns animais no estágio II apresentaram alguma variação no padrão morfológico e para ilustração das alterações foi selecionado um dos rins por cada animal.

Figura 10 - Imagens ultrassonográficas da arquitetura e morfologia renal dos animais incluídos no estudo

Fonte: (VIDANE, A. S. 2015).

Legenda: A: Animal 1 Clinicamente saudável, contornos renais regulares e clara definição cortico-medular. B-J: animais 2 a 9 acometidos com IRC, nota-se alterações na forma, tamanho, contornos irregulares, atrofia, perda da definição cortico-medular e presença de áreas hiperecogênicas referentes a áreas de falência renal e fibrose severa. A enumeração é correspondente à lista dos animais do quadro 1.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 ESTABELECIMENTO DE CULTIVO CELULAR

Desde a sua descoberta, as células-tronco vem sendo intensivamente estudadas e constituem uma alternativa promissora para o tratamento de inúmeras doenças crônicas e degenerativas, até então sem cura (WENCESLAU et al., 2011; GONÇALVES; AMBRÓSIO; PIEDRAHITA, 2014). Contudo, nos últimos anos, a busca por fontes acessíveis, seguras e que forneçam alto rendimento de CTs sem recurso a procedimentos invasivos tem sido o objeto de estudo de muitos investigadores. Devido as suas propriedades biológicas primitivas o âmnio constitui uma fonte promissora de células-tronco, com alto poder terapêutico (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013; VIDANE et al., 2014). As AMSCs são conhecidas por apresentarem elevada taxa de proliferação, alta plasticidade, imunotolerância e propriedades anti-inflamatórias (INSAUSTI et al., 2014).

O nosso grupo de pesquisa (VIDANE et al., 2014) isolou e caracterizou recentemente as células-tronco mesenquimais derivadas do âmnio de gatos domésticos. O estabelecimento de cultivo desta linhagem celular para a criação de banco de células foi bem sucedido neste estudo. Vinte e quatro horas após o cultivo inicial foi observada a presença de aglomerados celulares, alongados, fusiformes e aderentes à placa de cultivo. Estas características em cultivo são similares às descritas em MSCs da medula óssea dos gatos domésticos (MARTIN et al., 2002; WEBB; QUIMBY; DOW, 2012). Também corroboram com a descrição das características em cultivo das MSCs de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006). Estes aglomerados celulares sugerem um contato célula-célula e uma sinalização parácrina muito forte, fatores que desempenham um papel muito importante na proliferação, migração e diferenciação celular (VIDANE et al., 2013).

O completo nível de homogeneidade foi observado a partir da terceira passagem (P3), período em que apresentam maior taxa de proliferação e alta plasticidade (VIDANE et al., 2014). Resultados similares foram igualmente reportadas em estudos envolvendo a caracterização das células derivadas de membranas fetais caninas (URANIO et al., 2011) e felinas (IACONO et al., 2012). Por isso, as células foram criopreservadas nas passagens dois ou três (P2 ou P3) e usadas no transplante celular nas passagens três ou quatro (P3 ou P4), estágio em que apresentam maior desempenho no que diz respeito à capacidade de

proliferação e plasticidade. Nas passagens subsequentes registra-se uma considerável redução na taxa de proliferação caracterizada num aumento do tempo de geração e quiescência. Demerdash et al. (2015) reportaram que as MSCs exibem alta expressão dos genes de pluripotência e de proliferação e alto potencial para a diferenciação nas passagens iniciais, que decrescem gradualmente com o aumento da passagem. A idade e a passagem celular também tem um efeito altamente significativo no processo de migração, fixação e diferenciação celular após o transplante. No geral células em passagens maiores demonstram dificuldades para a migração e fixação no tecido alvo (SOHNI; VERFAILLIE, 2013).

A viabilidade celular antes do congelamento foi de aproximadamente 90%, porém, após a criopreservação pelo período mínimo de seis meses, registrou-se uma ligeira queda da viabilidade celular para 83%. Esta variação é pouco significativa em comparação aos estudos anteriores de MSCs dos tecidos fetais (URANIO et al., 2011). Este achado sugere que a criopreservação das AMSCs é viável, favorecendo a criação de banco de células visando estudos futuros ou aplicação em transplantes celulares.

Neste estudo foram usados embriões com idade de aproximadamente 35 dias de acordo com as estimativas descritas por nosso grupo Miglino et al. (2006) e Pieri et al. (2015). A idade gestacional possui um papel fundamental e pode influenciar nas propriedades morfológicas e funcionais das células derivadas do âmnio e, por conseguinte, influenciar no sucesso da terapia celular. Recentemente foi demonstrado que com o progresso da gestação, ocorre uma redução na expressão dos marcadores de pluripotência, redução na plasticidade e aumento da metilação do DNA (BARBONI et al., 2014). Em contrapartida, as células amnióticas no estágio inicial da gestação apresentam alta expressão dos marcadores de pluripotência o que representa o certo grau de risco a aplicação direta destas células, nesta fase, em transplantes celulares.

6.2 GERAÇÃO DE AMSCs TRANSGÊNICAS EXPRESSANDO eGFP

A transdução lentiviral para a geração das AMSCs transgênicas expressando GFP foi bem sucedida neste estudo. Após o *sorting*, a linhagem pura GFP demonstrou uma redução considerável na sua taxa de proliferação e dificuldades de ser mantida em cultivo por longo período. Alguns estudos relatam a dificuldade de manutenção de cultivo após a transdução lentiviral embora a transdução em fibroblastos tenha sido bem sucedida (LOIS et al., 2002).

O objetivo principal deste procedimento era a inoculação das AMSCs transgênicas expressando GFP em gatos com IRC para posterior rastreamento da sua migração e incorporação nos rins. Contudo, este propósito perdeu fundamento após uma análise criteriosa e discussão em grupo. Primeiro: qualquer manipulação a nível genético envolve uma probabilidade de ocorrência de alterações secundárias e indesejáveis. Neste caso o transplante de células transgênicas nos pacientes padecendo da IRC poderia constituir um risco associado, sendo recomendado para isto uma análise ou estudo prévio (teste de segurança no transplante em roedores). Segundo: devido à falta de acesso a equipamento que possibilite o rastreamento *in vivo* destas células em gatos com IRC (aparelho disponível só para pequenos roedores), o acesso aos órgãos seria necessário para o rastreamento celular. Isto só seria possível mediante biópsias ou acesso direto caso o animal viesse a óbito naturalmente e o proprietário concordasse em doar o cadáver. A realização de biópsias em gatos com IRC não é sustentável e acarreta graves complicações que podem piorar o quadro da IRC.

Por causa destas limitações, o transplante das células transgênicas não teve fundamento e não foi realizado.

6.3 INJEÇÃO INTRARRENAL DAS AMSCs

A ideia inicial do projeto era a inoculação intrarrenal bilateral das AMSCs guiado por ultrassom em pacientes com IRC. Com este procedimento a perda de células é mínima e há garantia de maior eficiência na incorporação das células nos tecidos/órgãos de interesse.

Procedeu-se a inoculação intrarrenal bilateral das AMSCs em um animal clinicamente saudável para se testar a eficiência do protocolo anestésico e a segurança do procedimento. O animal apresentou-se bastante estressado durante a manipulação, embora não se tenha registrado variações nos parâmetros do exame físico e clínico até sete (07) dias após a realização do procedimento. Foi observada ligeira hematúria de curta duração 2hs após o procedimento e o animal não apresentou alterações clínicas significantes.

A ausência de variações nos parâmetros clínicos (D0 *versus* D7) sugere que não houve nenhum efeito colateral devido ao transplante alogênico desta linhagem celular. A hematúria e o estresse na aplicação intrarrenal unilateral das MSCs derivadas da medula óssea e do tecido adiposo em gatos com IRC natural foi reportado em estudo anterior (QUIMBY et al., 2011). De acordo com os mesmos autores, a maioria dos animais incluídos no estudo teve a

progressão do quadro da IRC ao estágio terminal e acredita-se que o procedimento invasivo de injeção intrarrenal tenha precipitado esta ocorrência.

Embora o método de injeção intrarrenal das MSCs em gatos com IRC tenha se demonstrado viável neste estudo piloto, a sua abordagem rotineira na clínica veterinária é pouco provável. A sedação múltipla e o procedimento anestésico requerido para a injeção e monitoramento, contribuem consideravelmente para o estresse do animal e para o agravamento do comprometimento da função renal e, por conseguinte, a complicação do quadro clínico da IRC.

Por outro lado, apesar de garantir maior eficiência na incorporação das células no órgão de interesse, estudos anteriores sugerem que os mecanismos parácrinos, secreção de micovesículas/exossomos e de fatores que regulam a proliferação, migração e diferenciação celular são ativados após a injeção endovenosa das MSCs. Estes mecanismos são também responsáveis pela mobilização e ativação de outras células progenitoras bem como a modulação do sistema imune, garantindo os benefícios terapêuticos das células-tronco (TOGEL et al., 2007; TOGEL et al., 2009; SEMEDO et al., 2009; QUIMBY, 2015a).

Associado a estes fatores, foi realizado o procedimento da injeção endovenosa das AMSCs nos animais experimentais.

6.4 INJEÇÃO ENDOVENOSA DAS AMSCs

As desvantagens da aplicação endovenosa das MSCs incluem o risco de tromboembolismo pulmonar (efeito de primeira passagem pelo pulmão especialmente em pequenos roedores) devido à rápida injeção de grandes quantidades de células requeridas neste procedimento (DEAK et al., 2010; QUIMBY et al., 2013; QUIMBY et al., 2015b). Contudo, os mecanismos parácrinos renotrópicos, atividade imunomoduladora, anti-inflamatória e anti-fibrótica, ativados após a injeção endovenosa, são os mais importantes na terapia baseada em MSCs. Neste estudo, os animais experimentais receberam duas aplicações de AMSCs (aproximadamente 1×10^6 células/aplicação) na veia cefálica num intervalo de 21 dias. O número total das células foi estimado com base na viabilidade celular.

Não foram observados quaisquer efeitos adversos associados ao procedimento e, por este ser rápido, os animais se restabeleceram com facilidade após a manipulação. Dois operadores foram suficientes para executar a aplicação e não foi necessário sedação/anestesia

dos animais. A priori, estes achados sugerem que a injeção endovenosa das células-tronco em pacientes com IRC é um procedimento seguro e não constitui nenhum risco para esta categoria dos animais.

A qualidade de vida dos pacientes teve uma melhora significativa. Para além dos relatos dos proprietários em relação à melhoria na ingestão de água e alimentos, ao exame físico periódico foi observada melhora no estado clínico geral destes animais. A estabilização do quadro clínico também pode ser sustentada pela manutenção da maioria dos parâmetros clínicos dentro dos padrões de normalidade para gatos domésticos (parâmetros hematológicos e hemogasométricos) ao longo das diferentes fases de tratamento.

Os animais registraram uma redução significativa dos níveis de creatinina sérica (p -valor = 0,0280). A variação foi evidente logo após o início de tratamento (07 dias) e mais acentuada quando transcorridos dois (2) meses após a primeira aplicação das AMSCs. Associado a este achado, também foi registrado uma redução biologicamente significativa da razão proteína/creatinina urinária (p -valor = 0,1319). A redução na razão proteína/creatinina urinária é decorrente da redução gradual observada da proteinúria e aumento da excreção de creatinina na urina, o que consequentemente resultou na redução significativa dos níveis de creatinina sérica. Quimby et al. (2013) e Quimby et al. (2015b) também reportaram modesta melhoria da função renal em gatos com IRC natural tratados com MSCs do tecido adiposo embora a variação não tenha sido estatisticamente significativa. Em contrapartida, a progressão do quadro clínico e complicações da doença ao estágio terminal foi reportada após a injeção intrarrenal alogênica das MSCs da medula óssea em gatos com IRC (QUIMBY et al., 2011).

Apesar da redução significativa da creatinina no nosso estudo, este parâmetro não constitui o marcador mais sensível da função renal, contudo, é o parâmetro usado na rotina veterinária (DALTON, 2011, QUIMBY, 2015b). Fatores externos à função renal como massa muscular e desidratação podem influenciar os níveis de creatinina sérica. Por outro lado, alterações na função renal podem ocorrer sem implicar necessariamente alterações nos níveis de creatinina, embora esta observação deixe de ser real após o animal atingir níveis moderados da disfunção renal (KERL; COOK, 2005). Os animais experimentais do nosso estudo apresentavam grau de disfunção renal de grau II e III (IRIS, 2014) e não tiveram variação significativa no peso. Associado aos achados da creatinina sérica, a melhora na densidade urinária e a redução da proteinúria sugerem melhora na função renal.

Em estudos anteriores de aplicação das MSCs em modelos de IRC induzida em animais de laboratório, houve melhorias na função renal, redução da fibrose e inflamação intrarrenal

(NINICHUK et al., 2006; KIRPATOVSKII et al., 2007; CAVAGLIERI et al., 2009; SEMEDO et al., 2009; LEE et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2011; VILLANUEVA et al., 2013; WANG et al., 2013). Mesmo com aplicação de MSCs com características e potencial terapêutico similar, porque os achados em modelos induzido em roedores é diferente dos achados em modelo de doença natural em gatos?

Diversos fatores possuem um papel fundamental na terapia baseada em células-tronco dentre eles: migração, fixação (“*homing*”), diferenciação celular, estágio da doença e quantidade e via de administração.

Em modelo de doença induzida em roedores, o período entre a indução da doença e a aplicação da célula é relativamente curto (dias a semanas) e a lesão renal é considerada aguda e não crônica (SEMEDO et al., 2009; QUIMBY et al., 2013; QUIMBY et al., 2015a). Nestes casos o processo inflamatório é exacerbado e as alterações não condizem com as condições presentes na IRC natural em gatos domésticos que geralmente leva longos períodos (meses a anos) antes do diagnóstico (QUIMBY et al., 2013). A fibrose tecidual severa pode dificultar o processo de fixação (“*homing*”) e a difusão celular pelo tecido, limitando a sua interação com a matriz e consequentemente a diferenciação e reparação tecidual.

Um dos pontos fundamentais na medicina baseada em CTs é a migração, fixação (“*homing*”) e diferenciação das células transplantadas. Neste caso, o primeiro desafio após o transplante celular é a sua migração até ao foco da lesão. Diversos autores relatam que a migração ocorre principalmente pelo tropismo exercido pelas toxinas pró-inflamatórias dos tecidos lesionados bem como pela ação da atividade parácrina dos diferentes tipos celulares (TOGEL et al., 2007). O processo inflamatório potencia o processo da migração celular. Herrera et al. (2007) constataram alta expressão de hialurona em rins com injúria, que favorece o processo da migração celular por regular a adesão, proliferação e sobrevivência celular. A expressão de altos níveis de citocinas inflamatórias em gatos com IRC foi comprovada, sugerindo deste modo a presença de inflamação intrarrenal, fibrose e lesão vascular nestes animais (HABENICHT et al., 2013). A segunda etapa é a adesão/fixação das células nos focos da lesão (“*homing*”) que é guiada principalmente pela interação das CTs e a matriz extracelular do tecido. A etapa final é a diferenciação das CTs em células especializadas do tecido lesionada, etapa guiada pela interação da célula com o meio extracelular, contato célula-célula e sinalização parácrina com os diferentes tipos celulares (SOHNI; VERFAILLIE, 2013; VIDANE et al., 2013). A migração e o tropismo das MSCs para os rins na IRC em modelo de roedor foi comprovada (SEMEDO et al., 2009), porém, a

fibrose severa em gatos com IRC natural pode influenciar significativamente nestes processos.

A eleição da via de administração das CT's depende do tipo e localização da lesão bem como o tipo e estado clínico do paciente (QUIMBY et al., 2015a). Na doença renal, a via de administração endovenosa é considerada a via de eleição, pois possibilita a interação com os fatores endógenos que favorecem o tropismo e diferenciação celular bem como a ativação de diferentes mecanismos que participam e favorecem a reparação tecidual.

Ao exame ultrassonográfico não foi observada variação da arquitetura e morfologia renal durante o período de avaliação. O ultrassom não é um método adequado para a avaliação da morfologia renal em comparação com o exame histopatológico. Mesmo assim pode se considerar que, a melhora no quadro clínico e nos parâmetros de função renal não esteja apenas ligada a modelação estrutural, mas também às diversas ações secundárias das MSCs descritas na figura 3. Diversos investigadores envergam esforços para a compreensão dos mecanismos através dos quais as MSCs melhoram a função renal. Morigi (2004) reportou que as MSCs inoculadas por via endovenosa, tinham capacidade de migrar até ao rim, se fixarem e se diferenciarem em células do epitélio tubular. A atividade imunomoduladora e a tolerância imunológica são características importantes atribuídas às MSCs. Foi recentemente reportado que as MSCs melhoram a função renal pela mediação e regulação das células T em interação com os esplenócitos (HU et al., 2013). Para além da supressão da resposta imune pela modulação da proliferação e ativação das células T, as MSCs também modulam a atividade das células B, monócitos, macrófagos e outros intervenientes que medeiam o sistema imunológico (HADDAD et al., 2011; LANGE-CONSIGLIO et al., 2013; PLOCK et al., 2013; SOHNI; VERFAILLIE, 2013; INSAUSTI et al., 2014). Salientar que, embora não se tenha observado uma variação significativa dos linfócitos na contagem diferencial das células brancas, registrou-se uma modesta redução ao longo do tratamento. A redução dos linfócitos foi pouco significativa na primeira aplicação, porém, após a segunda aplicação das AMSCs a redução foi acentuada. Apesar de dispormos de poucos dados de imunomodulação, esta tendência pode ser atribuída ao efeito imunomodulador das AMSCs.

Fato importante é que a maioria dos parâmetros de função renal apresentou melhora significativa no D60 após o tratamento em relação ao D7 e D30 (melhora significativa com a segunda aplicação das AMSCs). Esta observação sugere que as MSCs tem uma ação a longo prazo, sendo importante reaplicações e monitoramento periódico. Em nosso estudo fez-se um “*follow up*” de dois animais experimentais transcorridos um (01) ano após o tratamento e os parâmetros de função renal estiveram significativamente abaixo dos valores observados antes

de tratamento (animal 3: Ureia = 61,4 e Creatinina = 1,81; animal 4: Ureia = 45,8 e Creatinina = 1,76). Todos os animais do experimento terão um “*follow up*” para o acompanhamento da evolução do quadro clínico da IRC. Mais ainda, na análise individual, observa-se que os animais que iniciaram o tratamento no estágio II da IRC, tiveram uma melhora mais significativa nos parâmetros clínicos que os animais do estágio III. Conclui-se com isto que quanto mais cedo se iniciar o tratamento maior é a chance de sucesso.

Embora os gases sanguíneos e a maioria dos eletrólitos não tenham variado significativamente e mantiveram-se dentro dos padrões de normalidade, foi observada uma hipocalcemia ionizada (iCa) e hipocalemia (K) ao longo de todo período experimental. O padrão dos níveis de iCa e K na IRC em cães e gatos não está clara, visto que pode ser influenciada com a dieta, aporte de alimentos e estado da doença (POLZIN et al., 2004). Os níveis séricos de cálcio e potássio são no geral regulados pelos rins, e a sua eliminação ocorre primeiramente por secreção tubular renal e em menor proporção por perda fecal e suor (POLZIN et al., 2004). Embora apareçam no filtrado glomerular a sua reabsorção ocorre antes de alcançar os túbulos distais. Por conseguinte, em pacientes com IRC a depleção dos níveis de K e iCa pode ser atribuído aos distúrbios dos mecanismos de secreção e reabsorção decorrentes da lesão tubular.

A relevância deste estudo é por ser o primeiro em modelo felino da IRC envolvendo maior número de animais experimentais, linhagem celular diferenciada e com acompanhamento clínico prolongando e “*follow up*” periódico dos animais. Contudo tem-se a limitação do uso de uma amostra heterogênea e devido à severidade da doença e escassez dos pacientes, não foi possível estabelecer controle negativo ou um teste duplo cego com uso de placebo.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados, conclui-se que as MSCs derivadas da membrana amniótica dos gatos domésticos têm um efeito renoprotetor e melhoram a função renal em gatos acometidos pela IRC, estabilizando o quadro clínico e a progressão da doença.

A injeção endovenosa das AMSCs constitui uma ferramenta importante para proporcionar boa qualidade de vida aos gatos com Insuficiência Renal Crônica.

O procedimento da inoculação intrarrenal das células-tronco para o tratamento da IRC em gatos domésticos não constitui um método eficaz para a rotina veterinária e representa certo risco (sedação, anestesia, hemorragia e estresse) para esta categoria de pacientes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACQUARONE, M.; de MELO, T. M.; MEIRELES, F.; BRITO-MOREIRA, J.; OLIVEIRA, G.; FERREIRA, S. T.; CASTRO, N. G.; TOVAR-MOLL, F.; HOUZEL, J.; REHEN, S. K. Mitomycin-treated undifferentiated embryonic stem cells as a safe and effective therapeutic strategy in a mouse model of Parkinson's disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. 97, p. 1-12, Apr. 2015.
- BARBER, P. J.; ELLIOTT, J. Feline chronic renal failure: calcium homeostasis in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. **Journal of Small Animal Practice**, v. 39, n. 3, p. 108-116, Mar. 1998.
- BARBONI, B.; RUSSO, V.; CURINI, V.; MARTELLI, A.; BERARDINELLI, P.; MAURO, A.; MATTIOLI, M.; MARCHISIO, M.; BONASSI SIGNORONI, P.; PAROLINI, O.; COLOSIMO, A. Gestational stage affects amniotic epithelial cells phenotype, methylation status, immunomodulatory and stemness properties. **Stem Cell Reviews**, v. 10, n. 5, p. 725-741, Oct. 2014.
- BARTGES, J. W. Chronic Kidney Disease in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 42, n. 4, p. 669-692, Jul. 2012.
- BOBERMIN, L. D.; WARTCHOW, K. M.; FLORES, M. P.; LEITE, M. C.; QUINCOZES-SANTOS, A.; GONÇALVES, C. A. Ammonia-induced oxidative damage in neurons is prevented by resveratrol and lipoic acid with participation of heme oxygenase. **NeuroToxicology**, v. 49, p. 28-35, Jul. 2015.
- CAVAGLIERI, R. C.; MARTINI, D.; SOGAYAR, M. C.; NORONHA, I. L. Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model. **Transplantation Proceedings**, v. 41, n. 3, p. 947-951, Apr. 2009.
- CHAKRABARTI, S.; SYME, H. M.; BROWN, C. A.; ELLIOTT, J. Histomorphometry of Feline Chronic Kidney Disease and Correlation With Markers of Renal Dysfunction. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 147-155. Jan. 2013.
- CHEW, D.; BARTHEZ, P. Diagnóstico de las enfermedades del tracto urinario superior en perros y gatos. **Revista Waltham Focus: estudio del tracto urinario**, p.26-32, 1988. Edição especial.
- COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; SPADARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with

basic fibroblast growth factor. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 8, p. 811-821, Dec. 2009.

COWGILL, L. D. Pathophysiology and management of anemia in chronic progressive renal failure. **Seminars In Veterinary Medicine And Surgery (Small Animal)**, v. 7, n. 3, p. 175-182, Aug. 1992.

CYRANOSKI, D. Stem cells boom in vet clinics. Horses, dogs and even a tiger have received the unproven therapies. Now, drug regulators plan to weigh in. **Nature**, v. 496, p. 148-149, Apr. 2013.

DALTON, R. N. Serum creatinine and glomerular filtration rate: perception and reality. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 8-11, Feb. 2011.

DEMERDASH, Z.; EL-BAZ, H.; MAHER, K.; HASSAN, S.; SALAH, F.; HASSAN, M.; ELZALLAT, M.; EL-SHAFEI, M.; TAHA, T. Effect of repeated passaging and cell density on proliferation and differentiation potential of cord blood unrestricted somatic stem cells. **New Horizons in Translational Medicine**, v. 2, n. 2, p. 67, Jan. 2015.

DEAK, E.; RUSTER, B.; KELLER, L.; ECKER, T. K.; FICHTNER, I.; SEIFRIED, E.; HENSCHLER, R. Suspension medium influences interaction of mesenchymal stromal cells with endothelium and pulmonary toxicity after transplantation in mice. **Cytotherapy**, v. 12, n. 2, p. 260-264, Apr. 2010.

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, n. 9, p. 1196-1202, May. 1987.

DIBARTOLA, S. P. Abordagem clínica e avaliação laboratorial da doença renal. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária. Doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2. p. 1687.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, Jan. 2006.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Textbook of veterinary anatomy**. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2010. 454 p.

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

ELLIOTT, J.; ELLIOTT, D. Abordagem nutricional – Doença renal crônica. **Vets Today Royal Canin Veterinary Diet**, n. 1, p. 1-4, Jul. 2009.

ELLIOTT, J.; RAWLINGS, J. M.; MARKWELALN, P. J.; BARBER, P. J. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure: effect of dietary management. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, n. 6, p. 235-242, Jun. 2000.

FEENEY, D. A.; JOHNSTON, G. R. Rins e ureteres. In: THRALL, D. E.(Ed.). **Diagnóstico de radiologia veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 693-700.

GALVÃO, A. L. B.; BORGES, J. C.; VIEIRA, M. C.; FERREIRA, G.; LÉGA, E.; PINTO, M. Alterações clínicas e laboratoriais de cães e gatos com doença renal crônica: revisão da literatura. **Nucleus Animalium**, v. 2, n. 1, p. 23-39, May. 2010.

GATTEGNO-HO, D.; ARGYLE, S. A.; ARGYLE, D. J. Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. **The Veterinary Journal**, v. 191, n. 1, p. 19-27, Jan. 2012.

GOLDSTEIN, R. E.; MARKS, S. L.; KASS, P. H.; COWGILL, L. D. Gastrin concentrations in plasma of cats with chronic renal failure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 6, p. 826-828, Sep. 1998.

GONÇALVES, N. N.; AMBRÓSIO, C. E.; PIEDRAHITA, J. A. Stem cells and regenerative medicine in domestic and companion animals: a multispecies perspective. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 4, p. 2-10. Oct. 2014.

GRAUER, G. F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. **The Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 35, n. 3, p. 581-596, May. 2005.

GRAUER, G. F. Distúrbios do sistema urinário. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 609-694.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabra Koogan, 1998. 639 p.

HABENICHT, L. M.; WEBB, T. L.; CLAUSS, L. A.; DOW, S. W.; QUIMBY, J. M. Urinary cytokine levels in apparently healthy cats and cats with chronic kidney disease. **Journal of Feline Medicine And Surgery**, v. 15, n. 2, p. 99-104, Feb. 2013.

EL HADDAD, N. Mesenchymal stem cells: immunology and therapeutic benefits. In: _____. **Stem cells in clinic and research**. Rijeka: InTech, 2011. p. 79-82.

HERRERA, M. B.; BUSSOLATI, B.; BRUNO, S.; MORANDO, L.; MAURIELLO-ROMANAZZI, G.; SANAVIO, F.; STAMENKOVIC, I.; BIANCONE, L.; CAMUSSI, G. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. **Kidney International**, v. 72, n. 4, p. 430-441, Aug. 2007.

HERZOG, E. L.; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v. 102, n. 10, p. 3483-3493, Nov. 2003.

HONGBAO, M. The discovery history of stem cell. **Stem cell**, v. 2, n. 1, p. 31-33, May. 2011.

HU, J.; ZHANG, L.; WANG, N.; DING, R.; CUI, S.; ZHU, F.; XIE, Y.; SUN, X.; WU, D.; HONG, Q.; LI, Q.; SHI, S.; LIU, X.; CHEN, X. Mesenchymal stem cells attenuate ischemic acute kidney injury by inducing regulatory T cells through splenocyte interactions. **Kidney International**, v. 84, n. 3, p. 521-531, Sep. 2013.

HUGHES, K. L.; SLATER, M. R.; GELLER, S.; BURKHOLDER, W. J.; FITZGERALD, C. Diet and lifestyle variables as risk factors for chronic renal failure in pet cats. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 55, n. 1, p. 1-15, Sep. 2002.

HUO, S.; SHI, P.; PANG, X. Culture and identification of human amniotic mesenchymal stem cells. **Chinese Medical Sciences Journal**, v. 25, n. 4, p. 211-214, Dec. 2010.

IACONO, E.; CUNTO, M.; ZAMBELLI, D.; RICCI, F.; TAZZARI, P. L.; MERLO, B. Could fetal fluid and membranes be an alternative source for Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in the feline species? A preliminary study. **Veterinary Research Communications**, v. 36, n. 2, p. 107-118, Jun. 2012.

INSAUSTI, C. L.; BLANQUER, M.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, A. M.; CASTELLANOS, G.; MORALEDA, J. M. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. **Stem Cells and Cloning : Advances and Applications**, v. 7, p. 53-63, Mar. 2014.

IRIS. Staging System for Chronic Kidney Disease (CKD) Novartis Animal Health Inc., Basel 2010000 – 67, 2014. Disponível em: <<http://www.iris-kidney.com/>>. Acesso em: 15 abr. 2014.

KANAMARU, T.; KAMIMURA, N.; YOKOTA, T.; NISHIMAKI, K.; IUCHI, K.; LEE, H.; TAKAMI, S.; AKASHIBA, H.; SHITAKA Y.; UEDA, M.; KATSURA, K.; KIMURA K.; OHTA, S. Intravenous transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells prevents memory impairment in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 1605, p. 49-58, Apr. 2015.

KANAYAMA, L. M. Ultra-sonografia intervencionista. In: CARVALHO, C. F. **Ultra-sonografia em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 347-358.

KEALY, J.K.; McALLISTER, H.; GRAHAM, J.P. **Radiografia e ultrassonografia do cão e do gato: o abdome**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 126 p.

KERKIS, I.; AMBROSIO, C. E.; KERKIS, A., MARTINS, D. S.; ZUCCONI, E.; FONSECA, S. A.; CABRAL, R. M.; MARANDUBA, C. M.; GAIAD, T. P.; MORINI, A. C.; VIEIRA, N. M.; BROLIO, M. P.; SANT'ANNA, O. A.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **Journal of Translational Medicine**, v. 3. n. 6, p. 35. Jul. 2008.

KERL, M. E.; COOK, C. R. Glomerular filtration rate and renal scintigraphy. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 31-38, Feb. 2005.

KIRPATOVSKII, V. I.; KAZACHENKO, A. V.; PLOTNIKOV, E. Y.; MAREI, M. V.; MUSINA, R. A.; NADTOCHII, O. N.; KONKOVA, T. A.; DROZHZEVA, V. V.; SUKHIKH, G. T. Experimental intravenous cell therapy of acute and chronic renal failure. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 143, n. 1, p. 160-165, Jan. 2007.

KOBAYASHI, D. L. PETERSON, M. E.; GRAVES, T. K.; LESSER, M.; NICHOLS, C. E. Hypertension in cats with chronic-renal-failure or hyperthyroidism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, n. 2, p. 58-62, Mar-Apr. 1990.

KONING, H. E.; MAIERL, L.; LIEBICH, H. G. Urinary system (organa urinaria). In: KONING, H. E.; LIEBICH, H. G. (Ed.). **Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas**. 4. ed. Stuttgart: Schattauer GmbH, 2004. 365 p.

KUIJK, E. W.; LOPES, S. M. C. S.; GEIJSEN, N.; MACKLON, N.; ROELEN, B. A. J. The different shades of mammalian pluripotent stem cells. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 2, p. 254-271, Mar-Apr. 2011.

KUWAHARA, Y.; OHBA, Y.; KITO, K.; KUWAHARA, N.; KITAGAWA, H. Association of laboratory data and death within one month in cats with chronic renal failure. **Journal of Small Animal Practice**, v. 47, n. 8, p. 446-450, Aug. 2006.

LANGE-CONSIGLIO, A.; ROSSI, D.; TASSAN, S.; PEREGO, R.; CREMONESI, F.; PAROLINI, O. Conditioned medium from horse amniotic membrane-derived multipotent progenitor cells: immunomodulatory activity in vitro and first clinical application in tendon and ligament injuries in vivo. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 22, p. 3015-3024, Nov. 2013.

LEAL, V. O.; LEITE-JUNIOR, M.; MAFRA, D. Metabolic acidosis in chronic kidney disease: the nutritional approach. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 1, p. 93-103, Jan-Feb. 2008.

LEE, S. R.; LEE, S. H.; MOON, J. Y.; PARK, J. Y.; LEE, D.; LIM, S. J.; JEONG, K. H.; PARK, J. K.; LEE, T. W.; IHM, C. G. Repeated administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells improved the protective effects on a remnant kidney model. **Renal Failure**, v. 32, n. 7, p. 840-848, Jul. 2010.

LEES, G. E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 34, n. 4, p. 867-885, Jul. 2004.

LEFEBVRE, S. Literature review – epidemiology of feline chronic kidney disease. **Banfield Applied Research & Knowledge Team**, Portland, October. 2011. p. 1-12.

LOIS, C.; HONG, E. J.; PEASE, S.; BROWN, E. J.; BALTIMORE, D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. **Science**, v. 295, n. 5556, p. 868-72, Feb. 2002.

LUSTOZA, M. D.; KOGIKA, M. M. Tratamento de Insuficiência Renal Crônica em Cães e Gatos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.1, n.1, p. 62-69, Jan-Mar. 2003.

MARTIN, D. R.; COX, N. R.; HATHCOCK, T. L.; NIEMEYER, G. P.; BAKER, H. J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 8, p. 879-886, Aug. 2002.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis**. 3. ed. St. Louis: Saunders, 2004. 307p.

MIGLINO, M.A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; WENCESLAU, C. V.; PFARRER, C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1699-1702. Mar. 2006.

MIHU, C. M.; CIUCA, D. R.; SORITAU, O.; SUSMAN, S.; MIHU, D. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 50, n. 1, p. 73-77, Feb. 2009.

MORIGI, M. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 7, p. 1794-1804, Jul. 2004.

NINICHUK, V.; GROSS, O.; SEGERER, S.; HOFFMANN, R.; RADOMSKA, E.; BUCHSTALLER, A; ANDERS, H. J. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. **Kidney International**, v. 70, n. 1, p. 121-129, Jul. 2006.

PIERI, N. C. G.; SOUZA, A. F.; CASALS, J. B.; ROBALLO, K. C. S.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S. Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs and Cats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 4, p. 625-631, Aug. 2015.

PLOCK, J. A.; SCHNIDER, J. T.; SOLARI, M. G.; ZHENG, X. X.; GORANTLA, V. S. Perspectives on the use of mesenchymal stem cells in vascularized composite allotransplantation. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 175, p. 1-7, Jul. 2013.

POLZIN, D. J. Chronic kidney disease in small animals. **The Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 41, n. 1, p. 15-30, Jan. 2011.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; JACOB, F.; ROSS, S. Insuficiência renal crônica. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária. Doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, p. 1721-1749.

POPPL, A. G.; GONZÁLES, F. H. D.; SILVA, S. C. Alterações clínico-laboratoriais em transtornos renais de cães (Canis familiaris). **Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação (MEDVEP)**, v. 2, n. 6, p. 92-98, Apr. 2004.

QUIMBY, J. M.; WEBB, T. L.; HABENICHT, L. M.; DOW, S. W. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 4, n. 2, p. 48-60, Apr. 2013.

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, n. 6, p. 418-426, Jun. 2011.

QUIMBY, J. M.; DOW, S. W. Novel treatment strategies for feline chronic kidney disease: A critical look at the potential of mesenchymal stem cell therapy. **The Veterinary Journal**, v. 204, n. 3, p. 241-246, Jun. 2015a.

QUIMBY, J. M.; WEBB, T. L.; RANDALL, E.; MAROLF, A.; VALDES-MARTINEZ, A.; DOW, S. W. Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. Mar. 2015b.

QUIMBY, J. M. Feline chronic kidney disease: understanding pathophysiology is the key to development of new treatments. **The Veterinary Journal**, v. 203, n. 3, p. 265-266. Mar. 2015a.

QUIMBY, J. M. Searching for biomarkers in feline chronic kidney disease: A new frontier. **The Veterinary Journal**, v. 206, n. 1, p. 3-4. Oct. 2015b.

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 the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 6, p. 949-957, Sep. 2006.

SEMEDO, P.; CORREA-COSTA, M.; CENEDEZE M. A.; MALHEIROS, D. M. A. C.; DOS REIS, M. A.; SHIMIZU, M. H.; SEGURO, A. C.; PACHECO-SILVA, A.; CAMARA, N. O. S. 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. 3063-3073, Dec. 2009.

SOHNI, A.; VERFAILLIE, C. M. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. **Stem Cells International**, v. 2013, n. 2013, p. 1-8, Sep. 2013.

SONCINI, M.; VERTUA, E.; GIBELLI, L.; ZORZI, F.; DENEGRI, M.; ALBERTINI, A.; WENGLER, G. S.; PAROLINI, O. Isolation and characterization of mesenchymal cells from

human fetal membranes. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, n. 4, p. 296-305, Jul-Aug. 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 of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 528-535, May-Jun. 2006.

TOGEL, F.; COHEN, A.; ZHANG, P.; YANG, Y.; HU, Z.; WESTENFELDER, C. Autologous and allogeneic marrow stromal cells are safe and effective for the treatment of acute kidney injury. **Stem Cells and Development**, v. 18, n. 3, p. 475-485, Apr. 2009.

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 of Physiology. Renal Physiology**, v. 289, n. 1, p. F31-F42, Jul. 2005.

TOGEL, F. WEISS, K.; YANG, Y.; HU, Z.; ZHANG, P.; WESTENFELDER, C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 292, n. 5, p. F1626-F1635, May. 2007.

URANIO, M. F.; VALENTINI, L.; CONSIGLIO, A. L.; CAIRA, M.; GUARICCI, A. C.; L'ABBATE, A.; CATAACCHIO, C. R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M. E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 5, p. 361-373, May. 2011.

VAC, M. H. Sistema Urinário: Rins, Ureteres, Bexiga Urinária e Uretra. In: CARVALHO, C. F. **Ultra-sonografia em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 111-130.

VIDANE, A. S.; SOUZA, A. F.; SAMPAIO, R.; BRESSAN, F. F.; PIERI, N. C. G.; MARTINS, D. S.; MEIRELLES, F. V.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Cat amniotic membrane multipotent cells are non-tumorigenic and are safe to be used in cell transplantation. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, v.7, p. 71-78, Aug. 2014.

VIDANE, A. S.; ZOMER, H. D.; OLIVEIRA, B. M.; GUIMARÃES, C. F.; FERNANDES, C. B.; PERECIN, F.; SILVA, L. A.; MIGLINO, M. A.; MEIRELLES, F. V.; AMBRÓSIO, C. E. Reproductive stem cells differentiation: Extracellular matrix, tissue microenvironment and growth factors direct the mesenchymal stem cell lineage commitment. **Reproductive Science**, v. 20, n. 10, p. 1137-1143, Oct. 2013.

VILLANUEVA, S. CARREÑO, J. E.; SALAZAR, L.; VERGARA, C.; STRODTHOFF, R.; FAJRE, F.; CÉSPEDES, C.; SÁEZ, P. J.; IRARRÁZABAL, C.; BARTOLUCCI, J.; FIGUEROA, F.; VIO, C. P. Human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue reduce functional and tissue damage in a rat model of chronic renal failure. **Clinical Science**, v. 125, n. 4, p. 199-210, Aug. 2013.

VILLANUEVA, S.; EWERTZ, E.; CARRION, F.; TAPIA, A.; VERGARA, C.; CÉSPEDES, C.; SÁEZ, P. J.; LUZ, P.; IRARRÁZABAL, C.; CARRENO, J. E.; FIGUEROA, F.; VIO, C. P. Mesenchymal stem cells injection ameliorates chronic renal failure in a rat model. **Clinical Science**, v. 121, n. 11, p. 489-499, Dec. 2011.

WAKI, M. F.; MARTORELLI, C. R.; MOSKO, P. E.; KOGIKA, M. M. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos - abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 10, p. 2226-2234, Oct. 2010.

WANG, Y.; HE, J.; PEI, X.; ZHAO, W. Systematic review and meta-analysis of mesenchymal stem/stromal cells therapy for impaired renal function in small animal models. **Nephrology**, v. 18, n. 3, p. 201-208, Mar. 2013.

WEBB, T. L.; QUIMBY, J. M.; DOW, S. W. In vitro comparison of feline bone marrow-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 2, p. 165-168, Feb. 2012.

WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D. S.; AMBROSIO, C. E.; LIZIER, N. F.; PIGNATARI, G. C.; KERKIS, I. Mesenchymal Progenitor Cells from Canine Fetal Tissues: Yolk Sac, Liver, and Bone Marrow. **Tissue Engineering Part A**, v. 17, n. 17-18, p. 2165-2176. Sep. 2011.

YABUKI, A.; MITANI, S.; FUJIKI, M.; MISUMI, K.; ENDO, Y.; MIYOSHI, N.; YAMATO, O. Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: Induction of myofibroblasts. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 2, p. 294-299, Apr. 2010.

ANEXO A

Cat amniotic membrane multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation

Atanasio S Vidane¹
 Aline F Souza¹
 Rafael V Sampaio¹
 Fabiana F Bressan²
 Naira C Pieri¹
 Daniele S Martins²
 Flavio V Meirelles²
 Maria A Miglino¹
 Carlos E Ambrósio²

¹Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Department of Veterinary Medicine, Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract: Amnion-derived mesenchymal stem cells (AMSCs) are multipotent cells with an enhanced ability to differentiate into multiple lineages. AMSCs can be acquired through noninvasive methods, and therefore are exempt from the typical ethical issues surrounding stem cell use. The objective of this study was to isolate and characterize AMSCs from a cat amniotic membrane for future application in regenerative medicine. The cat AMSCs were harvested after mechanical and enzymatic digestion of amnion. In culture medium, the cat AMSCs adhered to a plastic culture dish and displayed a fibroblast-like morphology. Immunophenotyping assays were positive for the mesenchymal stem cell-specific markers CD73 and CD90 but not the hematopoietic markers CD34, CD45, and CD79. Under appropriate conditions, the cat AMSCs differentiated into osteogenic, chondrogenic, and adipogenic cell lineages. One advantage of cat AMSCs was nonteratogenicity, assessed 4 weeks post injection of undifferentiated AMSCs into immunodeficient mice. These findings suggest that cat amniotic membranes may be an important and useful source of mesenchymal stem cells for clinical applications, especially for cell or tissue replacement in chronic and degenerative diseases.

Keywords: amnion, cats, cell differentiation, fetal membranes, mesenchymal cells

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) have awakened interest in regenerative medicine due to their high capability to proliferate and differentiate into specialized lineages under specific stimuli.^{1,2} MSCs are multipotent adult somatic stem cells derived from bone marrow and also from a wide variety of organs, including the reproductive system, eg, the endometrium and ovaries, and also postnatal organs.^{3–5} Extraembryonic and fetal tissue-derived stem cells have recently received increased interest in the field of regenerative medicine.^{6–10} These cells have an enhanced ability for differentiation into multiple specialized lineages under specific conditions, can be acquired through noninvasive methods and are exempt from ethical issues because the tissues they come from are discarded after birth.^{1,11–14} The amniotic membrane is widely used in tissue engineering to promote wound epithelialization¹⁵ and ocular surface reconstruction.¹⁶

The amniotic membrane comprises two types of cells, ie, amniotic epithelial stem cells that line the inner surface of the amnion and amniotic mesenchymal stem cells (AMSCs) that are dispersed throughout the stroma. Given their immunomodulatory properties, anti-inflammatory functions, and nontumorigenicity, AMSCs are a promising tool in cell therapy and regenerative medicine.^{9,10,17} Previous studies have

Correspondence: Carlos E Ambrosio
 Department of Basic Science, Faculty of Animal Science and Food Engineering,
 University of São Paulo, Av Duque de
 Caxias Norte 225, Pirassununga, São
 Paulo, Brazil, CEP 13635-900
 Tel +55 11 3565 4112
 Email ceambrosio@usp.br

characterized amniotic membrane-derived cells from full-term human,^{13,18–20} horse,¹⁴ cat,^{8,21} bovine,²² ovine,²³ rat,²⁴ and canine^{25,26} placenta.

The present study was aimed at isolating and characterizing progenitor mesenchymal cells from cat amniotic membranes for future applications in cell therapy (eg, autologous and allogeneic transplantation assays). We gave special attention to teratogenicity evaluation of this cell lineage after transplantation into immunodeficient mice since it is a key point in cell therapy.

Carnivores have been considered an attractive animal model for human disease trials.^{8,25–27} Besides the similarity of many genetic and chronic diseases with humans, carnivores can be handled easily, opening up possibilities for conducting experiments with larger numbers of animals with more confident results.

Materials and methods

Isolation and culture of cat AMSCs

All experiments and procedures were performed in accordance with the ethical principles in animal research by COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), and the study was approved by the Faculty of Animal Science and Food Engineering ethical committee (2011.1.1658.74.6).

The AMSCs were isolated from four fetal membranes (± 45 days) collected after routine ovariohysterectomy in cats under general anesthesia. The placentas were carefully washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) and transported in sterile standard collection containers. The amniotic membrane was mechanically separated from the allantoic sac, then washed repeatedly with sterile PBS at room temperature to remove blood and debris. The pieces of cat amniotic membrane were minced and subjected to enzymatic digestion (0.1% collagenase solution at 38.5°C). The products of digestion were passed through a 40 μ m nylon filter (BD Falcon nylon cell strainer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA, catalog number 352340). The cell solution was centrifuged at 303 g for 5 minutes at room temperature. The supernatant was discarded, and the cell pellet were resuspended in 1 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 solution (1:1, LGC Biotecnologia Ltda, Cotia, Brazil, catalog number 05) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids, 1% L-glutamine, and 1% penicillin and streptomycin. The isolated cells were seeded in cell culture dishes with Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 culture medium supplemented as described above at 38.5°C and with 5% CO₂. The culture medium was replaced 24 hours after initial plating to remove

the nonadherent cells. When plated cells reached 80%–90% confluence, the culture was recovered using trypsin 0.25% (Tryple Express, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for proliferation, in vitro differentiation, and immunophenotyping assays.

Cell quantification and doubling time analysis

The isolated cat AMSCs were counted using a Neubauer chamber. The trypan blue dye method (1:1) was used to access cell viability. Cell viability was expressed as a percentage of unstained (living) cells.

To determine the cell doubling time, AMSCs at passage one were seeded in triplicate in tissue culture dishes at a density of 1.3×10^3 cells/cm². Every 2 days, the culture was harvested using trypsin (0.25%), counted, and replated at the same density. Similar procedures were performed in the subsequent passages until passage 10. The population doubling time was calculated in each passage using the formula Ct/Cd , where Ct represents culture time between passage n and passage $n + 1$, and Cd represents the cell doubling. Cd was calculated using the formula $Cd = \ln(nf/ni)/\ln 2$, where nf represents harvested cells and ni represents seeded cells.¹⁴

Cryopreservation

The cat AMSCs were frozen at passage 0 to passage 1 in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 45% fetal bovine serum and 10% dimethyl sulfoxide. The cells were frozen over 24 hours at -80°C using a Mr Frosty freezing protocol, and were then transferred and stored in liquid nitrogen for 6 months. After thawing, some cells were used for proliferation assays and immunohistochemical studies, and others for in vitro differentiation.

Characterization by flow cytometry

The cat AMSCs were tested for immunoreactivity against CD73, CD90, and CD34 (goat polyclonal antibody, sc-7045, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), as well as CD45 and CD79 (mouse monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-101839).

The cat AMSCs were harvested at passage 3 by trypsinization and 3×10^4 cells/mL were transferred to Eppendorf tubes, washed twice with PBS, and fixed with 4% formaldehyde solution for 15 minutes at room temperature. After washing with PBS, the cells were blocked with bovine serum albumin (BSA) 2% for 45 minutes, washed with 0.2% BSA, and labeled with primary antibodies in 0.2% BSA (1:300) overnight at 4°C. The controls were incubated with 0.2%

BSA instead of primary antibodies. After that, the cells were washed in PBS and incubated with secondary conjugated antibodies (1:300; Alexa Fluor® 488 rabbit anti-goat IgG [H + L] *2 mg/mL* catalog number A11078, Invitrogen and Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG [H + L] *2 mg/mL* catalog number A11001, Invitrogen) for a duration of 45 minutes at room temperature in the dark. Labeled cells were transferred to Falcon tubes and analyzed by flow cytometry.

Immunocytochemical analysis

The cat AMSCs were harvested at passage 3 by trypsinization and counted, and 3×10^4 cells were seeded in chamber slides until cell confluence reached at least 90%. The culture was then fixed with 4% formaldehyde solution for 15 minutes at room temperature. To block nonspecific staining, the cells were incubated with 1% BSA for 30 minutes at room temperature. After that, the cells were labeled overnight with primary antibodies in 0.1% BSA (1:50) at 4°C and then incubated with secondary conjugated antibodies (1:100) for 45 minutes at room temperature in the dark. In order to identify the nuclei, the slides were assembled with Hoescht 33342 stain solution (10 µg/mL) for 15 minutes at room temperature and examined by immunofluorescence microscopy. In negative controls, the primary antibodies were replaced with buffer solution (BSA 1%) alone.

In vitro differentiation studies

Cells were seeded at passage 3 for all differentiation studies and cultured for 3 weeks at 38.5°C and in 5% CO₂. The controls were performed without induction medium.

For osteogenic differentiation, 4.2×10^3 cells/cm² were plated in osteogenic/adipogenic base medium (StemXVivo™, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA, catalog number CCM007) supplemented with penicillin-streptomycin (100:1). After reaching 50%–70% confluence, the base medium was removed and replaced with complete osteogenic differentiation medium (StemXVivo osteogenic supplement and completed StemXVivo osteogenic/adipogenic base medium at a 1:20). The differentiation medium was subsequently changed every 4 days. After 21 days, the cells were harvested and analyzed by Alizarin red staining to assess the calcium deposits characteristic of osteogenic differentiation.

For adipogenic differentiation, 2.1×10^4 cells/cm² were plated in StemXVivo osteogenic/adipogenic base medium supplemented with penicillin-streptomycin (100:1). The differentiation medium was subsequently changed every 4 days. After reaching 100% confluence, the

base medium were removed and replaced with complete adipogenic differentiation medium (StemXVivo adipogenic supplement and completed StemXVivo osteogenic/adipogenic base medium at a 1:100). Fat vacuole formation was analyzed by Oil Red O staining 21 days after supplementation.

For chondrogenic differentiation, 1.5×10^5 cells/mL were plated in Falcon tubes with 15 mL of chondrogenic base medium (R&D Systems, catalog number CCM005) and penicillin-streptomycin (100:1). After 3 days, the tubes were centrifuged at 303 g for 5 minutes, the base medium was removed, and the cell pellet was resuspended with complete chondrogenic base medium supplemented with chondrogenic supplement medium (100:1; StemXVivo human/mouse chondrogenic supplement, R&D Systems, catalog number CCM006). The differentiation medium was subsequently changed every 3 days. After 21 days, the tubes were centrifuged and the chondrogenic pellet was harvested and analyzed by toluidine blue staining.

Teratoma formation assays

The teratoma formation assays were performed at the Bioterium of Laboratory Animals (CEPTOX, FZEA, USP). Cat AMSCs (passage 4) were administered by intramuscular, subcutaneous, and intraperitoneal injection (2.5×10^4 cells/injection) in three immunodeficient (BALB/c-Nu) mice. At 45 days post injection, the animals were euthanized and transplanted tissues were collected for histopathology assay. Thick tissue sections were stained with hematoxylin and eosin.

Results

Isolation and culture of cat AMSCs

After 48 hours in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 medium, the cat AMSCs demonstrated plate adherence and reached 70%–80% confluence. The cell morphology was similar to that of fibroblast-like cells and indistinguishable from bone marrow-derived MSCs (Figure 1A and B), and rapid cell clustering was observed (Figure 1C). The cells were extensively expanded up to nine passages without any morphologically visible changes. The cell doubling time increased with increasing passage number (Figure 1E), meaning that the proliferation rate was reduced with successive passages. Cell viability analysis revealed that the percentage of living cells in culture (87.89%) was similar for both fresh and cryopreserved cells (Figure 1D) without depreciation of morphological or immunophenotypic features.

Figure 1 Feline amniotic membrane-derived cells. (A and B) Cell morphology, shows fibroblast-like cells adhering to plastic culture dishes (passage 0). (C) At high density, small cell clusters were observed. (D) Cell viability after cryopreservation; trypan blue staining (arrow heads). The percentages of dead cells were low in both fresh and cryopreserved cells (more dead cells stained in blue). (E) Cell doubling time for cat amnion-derived mesenchymal stem cells (expressed as the number of days required for cell number doubling) increased with increasing passage number. Bars: (A and D) 50 μ m (10 $\times$); (B and C) 50 μ m (20 $\times$).

Immunophenotyping assays

Based on immunocytochemistry and flow cytometry, the cat AMSCs expressed the specific surface markers for MSCs, ie, CD73 (89.5%) and CD90 (91.9%), but the hematopoietic-specific markers CD34 (47%), CD45 (1.7%), and CD79 (29.1%) were not expressed. The immunophenotypic profile was identical to that previously reported for bone marrow MSCs in other species (Figure 2A–L). However, 47% of CD34 expression was detectable by flow cytometry, inconsistent with data from studies in humans (Figure 2L).

In vitro differentiation

When cultured with adipogenic differentiation medium, the cat AMSCs under goes adipogenic cells, as revealed by intracellular lipid droplet deposition 21 days after supplementation (Figure 3A and B). Cells induced towards osteogenic differentiation revealed calcium mineralization after Alizarin red staining (Figure 3D and E). Proteoglycans deposition in chondrogenic induced cells was revealed by toluidine blue staining 21 days after induction (Figure 3G).

Teratoma formation

When undifferentiated AMSCs were injected into immunodeficient (BALB/c-Nu) mice, no teratomas were observed by 4 weeks post injection, and the transplanted animals survived without difficulty (Figure 4A). Histopathological analysis of muscle, brain, lung, heart, liver, kidney, spleen, intestine, and lymph node fragments revealed no morphological changes

(Figures 4B and 5A–I). These results suggest that cat AMSCs are safer for use in cell therapy.

Discussion

Several studies have aimed to clarify the application of stem cells in regenerative medicine. Therefore, identification of alternative sources of stem cells, with optimal biological proprieties for cell therapy and easy yield or isolation, has become a crucial issue in current studies. The amniotic membrane is a promising source of alternative progenitor cells (AMSCs) with an enhanced ability to proliferate and differentiate into multiple lineages due to their primitive embryonic origin. In this study, we focused on this alternative source of MSCs, acquired through non-invasive methods and therefore ethically acceptable. The cat amnion is discarded after birth and could be collected after cesarean or ovariohysterectomy in pregnant cats.

We successfully isolated and expanded MSCs from cat amniotic membrane. These cells adhered to the culture dishes, showed fibroblastic-like morphology, and had high self-renewal capability. A sufficient level of homogeneity was reached at passage 3. These data are consistent with previous studies in fetal membranes from dogs²⁵ and recent trials involving feline fetal fluids and membranes.⁸ The population doubling time increased considerably from passage 7. These values are higher than those reported in previous studies of horse,¹⁴ dog,²⁵ and feline fetal membranes.^{8,21} In the same way, in the data reported for dog, cat, and horse amnion-derived cells, the doubling time values tended to increase with increasing passages; however,

Figure 2 Photomicrographs and histogram overlays of immunophenotyping assays used to evaluate the expression patterns of specific surface markers. (**A, B, G and H**) Mesenchymal stem cell markers (CD73 and CD90) were detected in cat-derived mesenchymal cells; however, hematopoietic markers (CD34, CD45, and CD79) were not detected (**D–F** and **J–L**). (**C** and **I**) Immunocytochemical and flow cytometry negative controls, respectively. The histograms represent the number of cells relative to the fluorescence intensity of the control (ctr) cells. (**A–F**) Bars 50 μ m (20 $\times$).

the values are not higher than 3 days.^{8,14,25} On the other hand, Rutigliano et al²¹ reported higher doubling times (5 days) in the first passage of culture.

Although population doubling time increased considerably with successive passages, cell viability was high and similar for both fresh and cryopreserved cells. These data are in agreement with those reported for MSCs derived from the dog²⁵ and suggest that these cell lineages are ideal for cell banking for future application in cell transplantation. On the other hand, amniotic epithelial cells (polygonal or columnar-like cells, derived from the amniotic epithelium)²¹ were not observed in our primary cultures, confirming successful

isolation of the MSC lineage from cat amnion. Further, when the cat AMSCs were cultured in high density at passage 0, formation of small cell clusters was observed, suggesting strong cell-cell contact and signaling. Cell-cell contact and autocrine and paracrine signaling play a key role in the commitment and specification of MSC.²

The cat AMSCs expressed specific MSC antigen markers, CD73 and CD90, but not hematopoietic surface markers CD34, CD45, and CD79. This expression pattern was expected, and similar results were reported in previous studies of feline bone marrow-derived stem cells.²⁸ These data confirm that amniotic membrane MSCs were successfully

Figure 3 In vitro differentiation of the cat amnion-derived mesenchymal stem cells. (A and B) Oil Red O staining after adipogenic induction revealed lipid drops 21 days after supplementation. (D and E) Alizarin red staining revealed mineralized matrix deposits after osteogenic induction. (G) Proteoglycans deposition in chondrogenic induced cells was revealed by blue toluidine staining 21 days after induction. (C and F) Oil Red O and Alizarin red staining negative controls. (A and G) Bars 20 μ m (20 $\times$). (B, C, E and F) 10 μ m (40 $\times$). (D) 50 μ m (10 $\times$).

isolated without blood or debris contamination. However, this study demonstrated a high level of expression of CD34 at passage 4, inconsistent with data from studies in humans. The explanation for this finding is that the AMSCs may have angiogenic potential, also suggested by other authors.^{8,14,29} In both cell populations (AMSCs and amniotic epithelial cells) in the horse,¹⁴ the CD34 marker started to be expressed at passage 5. This variation in membrane expression markers may occur from one passage to another because of acquisition

of angiogenic potential. On the other hand, our data could be related to the use of non feline-specific antibodies. Further investigations must be carried out in order to clarify these variations in expression of molecular markers in various stages of cell specification and/or use more specific techniques. Previous studies suggest that these cells are still of fetal origin and retain the properties of primitive multipotent stem cells.^{1,29,30}

Recently, the AMSCs have awakened a great deal of interest in cell therapy due to their immunomodulatory properties, ease of accessibility, and high yield. Moreover, they have been shown to have a high ability to differentiate into different cell lineages. Using specific culture medium, we demonstrated that cat AMSCs differentiated into osteogenic, chondrogenic, and adipogenic cells. These results suggest that cat AMSCs may represent an important source of multipotent MSCs with properties identical to those of bone marrow-derived MSCs. The ability of MSCs to acquire a specific phenotype under defined conditions (microenvironment and interaction with soluble growth factor) is the critical issue for use of stem cells in regenerative medicine. Previous studies report the similarly high plasticity of MSCs derived from different organs post natally.^{12,18,21,25,31}

Figure 4 Amnion-derived mesenchymal stem cells were introduced into immunodeficient (BALB/c-Nu) mice via intramuscular, subcutaneous, and intraperitoneal injection (2.5×10^4 cells/injection). After four weeks post-injection, no teratomas were formed in the injected animals (A) and the macroscopic analysis of the viscera in the all injected animals revealed no morphological changes (B).

Abbreviations: SC, subcutaneous; IM, intramuscular; IP, intraperitoneal.

Figure 5 Photomicrographs of different organs collected from euthanized nude mice, four weeks post amnion-derived mesenchymal stem cell injection via the intramuscular (IM) and intraperitoneal (IP) routes. (A) Longitudinal section of cardiac muscle showing a common arrangement of muscle fibers with centralized nuclei. (B) Photomicrograph of the liver, central vein and numerous hepatic cords lining the sinusoidal capillaries. (C) Lung morphology, pulmonary alveoli, and alveolar ducts. (D) Cross-section of the kidney and overview of the glomeruli and renal tubules. (E) Cross-section of the spleen, normal distribution of lymphatic nodules, trabeculae, and white and red pulp. (F) Brain photomicrograph showing different layers of the cerebral cortex. (G) Longitudinal section of thigh skeletal muscle, nuclei in periphery of muscle fibers, and numerous transverse striations. (H) Small intestine, numerous glands immersed in the submucosal tissue. (I) Normal distribution of medullary cords and medullary sinuses of lymph node, with adipocytes in the periphery. (A, B, C, E and G) Bars 20 μ m (40 $\times$), (D, F and H) 20 μ m (20 $\times$), and (I) 50 μ m (20 $\times$).

Abbreviation: Ctr, control.

When cat AMSCs were injected into immunodeficient (BALB/c-Nu) mice, no tumors were generated by 4 weeks post injection, and the transplanted animals survived without difficulty. Photomicrographs of a number of organs collected from euthanized mice revealed no morphological changes when compared with the control group. This finding suggests that these cells can be used for cell transplantation without any risk of teratoma generation. Carnivores have been considered an attractive animal research model to study human disease. The findings in the feline model can be substantiated for future application in models of human disease, which are common between human and carnivores.

Conclusion

Based on these results, we conclude that the cat amniotic membrane may be a valuable alternative MSC source, and could be of interest to cell therapy researchers in a canine model system. One advantage of cat AMSCs is their nonteratogenicity, and they are safe for use in cell therapy.

Acknowledgments

We thank the Conselho Nacional de Pesquisa Brasil and the Ministério da Ciência e Tecnologia Moçambique for financial support.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod*. 2007;77(3): 577–588.
2. Vidane AS, Zomer HD, Oliveira BM, et al. Reproductive stem cell differentiation: extracellular matrix, tissue microenvironment, and growth factors direct the mesenchymal stem cell lineage commitment. *Reprod Sci*. 2013;20(10):1137–1143.
3. Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119(11):2204–2213.
4. Mohr S, Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Sager R, Surbek DV. Generation of an osteogenic graft from human placenta and placenta-derived mesenchymal stem cells. *Reprod Sci*. 2010;17(11): 1006–1015.
5. Brolio MP, Vidane AS, Zomer HD, et al. Morphological characterization of the progenitor blood cells in canine and feline umbilical cord. *Microsc Res Tech*. 2012;75(6):766–770.
6. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(3): 664–673.
7. Fernandes RA, Wenceslau CV, Reginato AL, Kerkis I, Miglino MA. Derivation and characterization of progenitor stem cells from canine allantois and amniotic fluids at the third trimester of gestation. *Placenta*. 2012;33(8):640–644.
8. Iacono E, Cunto M, Zambelli D, Ricci F, Tazzari PL, Merlo B. Could fetal fluid and membranes be an alternative source for mesenchymal stem cells (MSCs) in the feline species? A preliminary study. *Vet Res Commun*. 2012;36(2):107–118.
9. Lage-Consiglio A, Rossi D, Tassan S, Perego R, Cremonesi F, Parolini O. Conditioned medium from horse amniotic membrane-derived multipotent progenitor cells: immunomodulatory activity in vitro and first clinical application in tendon and ligament injuries in vivo. *Stem Cells Dev*. 2013;22(22):3015–3024.

10. Insausti CL, Blanquer M, García-Hernández AM, Castellanos G, Moraleda JM. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning*. 2014;7: 53–63.
11. Huo S, Shi P, Pang X. Culture and identification of human amniotic mesenchymal stem cells. *Chin Med Sci J*. 2010;25(4):211–214.
12. Chen J, Lu Z, Cheng D, Peng S, Wang H. Isolation and characterization of porcine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. *PLoS One*. 2011;6(5):e19964.
13. Diaz-Prado S, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. *Tissue Eng Part C*. 2011;17(1):49–59.
14. Lage-Consiglio A, Corradetti B, Bizzaro D, et al. Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012;6(8):622–635.
15. Insausti CL, Alcaraz A, Garcia-Vizcaino EM, et al. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Repair Regen*. 2010;18(4):368–377.
16. Plummer CE, Ollivier F, Kallberg M, et al. The use of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: a review and series of 58 equine clinical cases (2002–2008). *Vet Ophthalmol*. 2009;12 Suppl 1:17–24.
17. Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *J R Soc Interface*. 2010;7 Suppl 6:S689–S706.
18. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(4):296–305.
19. Mihiu CM, Ciuca DR, Soritau O, Susman S, Mihiu D. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. *Rom J Morphol Embryol*. 2009;50(1):73–77.
20. Diaz-Prado S, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, et al. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem*. 2010;111(4):846–857.
21. Rutigliano L, Corradetti B, Valentini L, et al. Molecular characterization and in vitro differentiation of feline progenitor-like amniotic epithelial cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(5):133.
22. Corradetti B, Meucci A, Bizzaro D, Cremonesi F, Lange-Consiglio A. Mesenchymal stem cells from amnion and amniotic fluid in the bovine. *Reproduction*. 2013;145(4):391–400.
23. Mauro A, Turriani M, Ioannoni A, et al. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. *Vet Res Commun*. 2010;34:S25–S28.
24. Marcus AJ, Coyne TM, Rauch J, Woodbury D, Black IB. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation*. 2008;76(2):130–144.
25. Uranio MF, Valentini L, Lange-Consiglio A, et al. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Mol Reprod Dev*. 2011;78(5):361–373.
26. Valentini L, Uranio MF, Consiglio AL, et al. Isolation, proliferation, and characterization of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix in the dog. *Reprod Fertil Dev*. 2011;23(1):252–253.
27. Seo MS, Jeong YH, Park JR, et al. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci*. 2009;10(3):181–187.
28. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol*. 2002;30(8):879–886.
29. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol*. 2007;7:11.
30. Manuelpillai U, Moodley Y, Borlongan CV, Parolini O. Amniotic membrane and amniotic cells: Potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? *Placenta*. 2011;32:S320–S325.
31. Chang Y-J, Hwang S-M, Tseng C-P, et al. Isolation of mesenchymal stem cells with neurogenic potential from the mesoderm of the amniotic membrane. *Cells Tissues Organs*. 2010;192(2):93–105.

Stem Cells and Cloning: Advances and Applications

Publish your work in this journal

Stem Cells and Cloning: Advances and Applications is an international, peer-reviewed, open access journal. Areas of interest in stem cell research include: Embryonic stem cells; Adult stem cells; Blastocysts; Cord blood stem cells; Stem cell transformation and culture; Therapeutic cloning; Umbilical cord blood and bone marrow cells; Laboratory,

animal and human therapeutic studies; Philosophical and ethical issues related to stem cell research. This journal is indexed on CAS. The manuscript management system is completely online and includes a quick and fair peer-review system. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/stem-cells-and-cloning-advances-and-applications-journal>

Dovepress