UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

LARA CAROLINA MARIO

**Isolamento, expansão e caracterização de células progenitoras
renais derivadas de mesonefro e metanefro de gato doméstico
(*Felis catus*)**

São Paulo
2019

LARA CAROLINA MARIO

**Isolamento, expansão e caracterização de células progenitoras renais
derivadas de mesonefro e metanefro de gato doméstico (*Felis catus*)**

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 – Brasil e Universidad de La Frontera, Temuco - Chile para obtenção do título de Dupla Titulação de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Miglino

Co-orientadora: Profa. Dra. Samirah Abreu Gomes

**Co-orientador convênio dupla titulação
Universidad de La Frontera, Chile:** Prof.
Dr. Mariano Del Sol Calderón

São Paulo

2019

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3758
FMVZ

Mario, Lara Carolina
Isolamento, expansão e caracterização de células progenitoras renais derivadas de mesonefro e metanefro de gato doméstico (*Felis catus*) / Lara Carolina Mario. – 2019.
101 f. : il.

Tese (Doutorado com Dupla Titulação em Ciências) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, Brasil, e Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2019.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Miglino.

Coorientadores: Profa. Dra. Samirah Abreu Gomes.

Prof. Dr. Mariano Del Sol Calderón.

1. Rim. 2. Doença crônica renal. 3. Terapia celular. 4. Embriologia. 5. Morfologia. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Isolamento, expansão e caracterização de células progenitoras renais derivadas de mesonefro e metanefro de gato doméstico (*Felis catus*).", protocolada sob o CEUA nº 9798110215 (ID 005608), sob a responsabilidade de **Maria Angélica Miglino** - 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 - está 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, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/10/2018.

We certify that the proposal "Isolation, expansion and characterization of renal progenitor cells derived of mesonephro and metanephro from domestic cat (*Felis catus*).", utilizing 12 Cats (12 females), 4 Heterogenics mice (4 males), protocol number CEUA 9798110215 (ID 005608), under the responsibility of **Maria Angélica Miglino** - 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 - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as 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 (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/17/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2015** a **03/2017**

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem: **Animais provenientes de campanha**

Espécie: **Gatos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **1 a 8 anos**

N: **12**

Linhagem: **SRD**

Peso: **2 a 5 g**

Origem: **Biotério de camundongos do Instituto de Ciências Biomédicas/USP**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **1 a 2 semanas**

N: **4**

Linhagem: **camundongos BALB/c nude**

Peso: **20 a 30 g**

Local do experimento: Os úteros gravídicos após serem descartados na campanha de castração eletiva realizada na cidade Embu das Artes, serão coletados e trazidos para a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no qual os experimentos ocorrerão no laboratório de cultivo celular e no laboratório de histologia animal do departamento de Anatomia da FMVZ/USP;

São Paulo, 06 de janeiro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Autor: MARIO, Lara Carolina

Título: Isolamento, expansão e caracterização de células progenitoras renais derivadas de mesonefro e metanefro de gato doméstico (*Felis catus*).

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 – Brasil e Universidad de La Frontera, Temuco - Chile para obtenção do título de Dupla Titulação de Doutor em Ciências.

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a Deus, por sempre iluminar meu caminho e me ajudar a tomar as escolhas corretas para minha vida.

Aos meus amados pais (Maria Angélica Ransani Mario e José Donizeti Mario). Por todo apoio e incentivo durante esta longa jornada. Obrigada por sempre me apoiarem e acreditarem em mim e por compartilharem deste sonho comigo, dedico a vocês esta grande vitória de minha vida, com a mais profunda gratidão, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois Ele foi meu porto seguro em todos os momentos de angústia e aflição e nas minhas alegrias e conquistas também.

Aos meus pais (Maria Angélica Ransani Mario e José Donizeti Mario), que sempre me apoiaram e me incentivaram a nunca desistir de um sonho, por mais difícil e inalcançável que ele pareça. Agradeço todo o carinho recebido durante todos estes anos de pós-graduação, mesmo estando estressada com meu projeto, sempre recebi de vocês muito amor e carinho, que me auxiliaram a ter força para finalizar esta grande conquista em minha vida.

Ao meu namorado (Alirio Gómez Gómez) por todo carinho, paciência e apoio durante estes últimos anos do meu doutorado.

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Angelica Miglino, pela confiança, por compartilhar seus conhecimentos e por todos os ensinamentos recebidos durante esta longa jornada, minha eterna gratidão.

A minha co-orientadora Samirah Abreu Gomes por todo o apoio, dedicação e contribuição para que este projeto seja realizado. Agradeço todo o carinho e atenção durante esses quatro anos, e por toda amizade e palavras de apoio quando mais precisava, muito obrigada por toda ajuda e paciência comigo.

Ao meu co-orientador pelo programa de dupla titulação com a Universidad de La Frontera, Chile, Prof. Dr. Mariano Del Sol Calderón e Profa. Dra. Bélgica Vasquez, por todo apoio e ensinamentos durante minha estadia no Chile.

A minha tutora do estágio realizado na University of Miami, Profa. Dra. Claudia Rodrigues, por me receber em seu laboratório e por todos os ensinamentos recebidos durante os seis meses a qual passei em Miami.

Ao Coordenador do Programa de Anatomia, Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, por todo apoio durante estes quatro anos da minha pós-graduação e também por todo incentivo e ajuda para que fosse possível meu convênio de dupla titulação.

A Profa. Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira, por toda ajuda prestada desde o início até o final da confecção deste projeto, muito obrigada por sempre encontrar um tempo para me auxiliar nos momentos em que mais precisei, a você toda minha eterna admiração e gratidão.

Ao Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron, por sua amizade e por sua contribuição neste projeto, e por toda paciência em me ensinar, muito obrigada.

A Profa. Dra. Ana Flávia de Carvalho, pela amizade e confiança, por ser a primeira a me incentivar na área da pesquisa, por ter aceitado me orientar na iniciação científica, meu eterno agradecimento e admiração.

Aos meus amigos que estão comigo em todos os momentos, compartilhando minhas vitórias e minhas angústias, Jéssica Borghesi, Natal (Franceliusa Delys de Oliveira), Adriana Raquel de Almeida da Anunciação, Rafael Rayashi, Ana Carolina Rabelo, Luciana Durand Neira, Miguel Lobo, Luciano Cesar Leonel, Fausto Fernandes, Juliana Nhanharelli, Katia Pimentel, Ana Carolina Martins dos Santos, Paulo Ramos, Ana Lídia Jacintho Delgado, Maria Clara Mendes da Silva, Leila Cabral Moreira, Ana Maria Valencia, Leandro Pedrosa, Marcos Vinícius Mendes Silva. Um agradecimento especial por me apoiarem durante toda esta fase de minha vida.

Aos meus amigos de orientação que estiveram presentes durante esta importante fase de minha vida: Gustavo Matias, Paula Fratini, Rodrigo Barreto, Tais Sasahara, Luciana Simões, Arthur Martins, Carla Carvalho, Nathia Rigoglio, Marcio Pereira, César Prado, muito obrigada por compartilharem comigo bons momentos durante a pós-graduação.

Aos meus queridos ICs (alunos de iniciação científica), Maiara Pepe de Moraes, Anna Carolina Dell'Aquila, Bárbara Fidalgo Paretsis, Mariani Kolecha e Gabriela Cabral, a qual eu tive o prazer de poder ensiná-los um pouquinho do conhecimento que me foi

passado. Com vocês eu pude aprender e crescer profissionalmente e ter a certeza de que nasci para ensinar. Muito obrigada por toda ajuda prestada durante todos estes anos.

A todos os amigos da Univerdidad de la Frontera, que sempre me acolheram e me auxiliaram, um agradecimento especial aos amigos Consuelo Arias, Loreto Umanzor, Cristian Vásquez, Paulo Salinas, Daniel Conei, Clivia Guerrero por todo apoio recebido durante minhas idas ao Chile.

Aos amigos do laboratório da University of Miami, Mitscheli da Rocha, Yue Qi, Jacqueline Machi, Carolina Carvalho Dias, Alejo Morales e Jack Stahl, por compartilhar seus conhecimentos e bons momentos durante minha estadia em Miami.

A todos meus amigos e familiares que mesmo de longe sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os momentos e decisões de minha vida.

Aos técnicos de laboratório, Dra. Rose Eli, por toda contribuição científica e amizade. E ao técnico Ronaldo Agostinho, um agradecimento especial por sua amizade, paciência e por todo o auxílio na parte histológica do meu projeto.

A Dra. Camilla Fanelli, por todo conhecimento na área de biologia molecular na fase final dos meus experimentos.

A secretaria do Departamento de Anatomia Daura Vaz e também a ex-secretária do departamento de Anatomia Jaqueline Martins de Santana, obrigada por toda atenção e dedicação prestados durante estes quatro anos da minha pós-graduação.

Agradeço a todos os funcionários que sempre nos proporcionaram um ambiente muito agradável, principalmente a Paulinha, que contagia a todos com sua alegria e bom humor. E também ao Augusto por toda ajuda prestada com os animais.

A toda equipe da biblioteca, por toda dedicação e atenção durante todos estes anos da minha pós-graduação.

Um agradecimento especial ao médico veterinário Erik Neves Rodrigues, responsável pela doação de embriões e fetos da campanha de castração eletiva realizada na cidade de Embu das Artes, São Paulo. E a toda sua equipe por sempre estarem disponíveis para ajudar e nos receber, gostaria de agradecer de forma especial a veterinária Gabriela Rezende por toda ajuda e amizade durante todos estes anos.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e pelo apoio durante minha pós-graduação.

Ao programa de pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres por todo apoio durante todos esses anos da minha pós-graduação. E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

Por fim, agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior), pela oportunidade e financiamento deste trabalho e pelo CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento do meu estágio no exterior.

EPÍGRAFE

“Não se deve ir atrás dos objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços” (Albert Einstein).

RESUMO

MARIO, L. C. **Isolamento, expansão e caracterização de células progenitoras renais derivadas de mesonefro e metanefro de gato doméstico (*Felis catus*).**

[Isolation, expansion and characterization of renal progenitor cells derived of mesonephro and metanefro from domestic cat (*Felis catus*)]. 2019. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A doença renal crônica (DRC) é amplamente encontrada em felinos. É caracterizada pela deficiência estrutural e funcional dos rins e pela perda gradual e definitiva do número de néfrons funcionais, com posterior redução da taxa de filtração glomerular. A DRC é uma enfermidade de difícil tratamento devido às limitações terapêuticas existentes, as quais apenas minimizam os danos causados aos pacientes. A inexistência de qualquer tratamento específico para a DRC fortalece a necessidade de investimento em pesquisas e em terapias inovadoras aplicadas, incluindo a terapia celular. Em gatos, muitos modelos já foram preconizando com o uso de diversos tipos de celulares, tais como, derivados da medula óssea, âmnio, e tecido adiposo. Porém até o presente momento, nenhum desses estudos obtiveram sucesso significativo no tratamento dessa enfermidade. Observando portanto, a carência de uma terapia celular específica para a DRC, e sabendo que muito estudos estão sendo realizados com o uso células progenitoras, ou seja, células as quais já estão destinadas a serem um tecido ou órgão específico, este trabalho buscou mediante estudo das células derivadas de mesonefro e metanefro de gatos domésticos em diferentes estágios gestacionais, uma nova fonte para terapia celular, afim de testar qual destes diferentes tipos celulares seria o melhor para tratamento das doenças renais. Desta forma, embriões e fetos de gato foram coletados da campanha de castração eletiva realizada na cidade de Embu das Artes, São Paulo. Os mesonefros e metanefros foram dissecados e postos em cultivo celular. Na sequência foram realizados testes de viabilidade e metabolismo celular, análise de proteínas específicas mediante a técnica de citometria de fluxo, potencial tumorigênico, e diferenciação celular para células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas. Foi observado que estas células possuíam plasticidade e clonicidade celular, apresentavam expressões positivas para

marcadores renais e expressão negativa para proteínas do complexo principal de histocompatibilidade, também não apresentaram formação tumorigênicas e possuíam a capacidade de se diferenciar em diversos tecidos, tais como adipócitos, osteócitos e condrócitos. Portanto podemos concluir que estas novas linhagens celulares apresentam todas as características necessárias para tornarem-se um novo modelo em terapia celular para gatos com DRC. Dentre estas quatro linhagens, elegemos a as células provenientes de metanefro de final do período gestacional com as melhores características dentre as demais, pois apresentam maiores expressões de proteínas específicas renais, além apresentarem uma estrutura renal mais concisa e mais bem estabelecida.

Palavras-chaves: Rim. doença crônica renal. terapia celular. embriologia. morfologia

ABSTRACT

MARIO, L. C. **Isolation, expansion and characterization of renal progenitor cells derived of mesonephro and metanefro from domestic cat (*Felis catus*).**

[Isolamento, expansão e caracterização de células progenitoras renais derivadas de mesonefro e metanefro de gato doméstico (*Felis catus*)]. 2019. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Chronic kidney disease (CKD) is widely found in felines. It is characterized by structural and functional deficiency of the kidneys and by the gradual and definitive loss of the number of functional nephrons, with subsequent reduction of the glomerular filtration rate. CKD has difficult treatment. This is because there are some therapeutic limitations, which only minimize the harm caused to patients. The lack of any specific treatment for CKD strengthens the need for investment in research and innovative applied therapies, including cell therapy. In cats, many models have been advocating the use of several types of cells, such as bone marrow, amnion, and adipose tissue. However, until now, none of these studies have been significantly successful in treating this disease. Therefore, the lack of a specific cellular therapy for CKD, and knowing that a lot of studies are being performed with the use of progenitor cells, that is, cells that are already destined to be a specific tissue or organ. The aim of this study was to study the mesonephrine and metanephric cells of domestic cats at different gestational stages, a new source for cellular therapies, in order to test which of these different cell types would be the best for renal diseases. In this way, embryos and cat fetuses were collected from the elective castration campaign held in the city of Embu das Artes, São Paulo. The mesonephros and metanephros were dissected and placed in cell culture. Cell viability tests, specific protein analysis using flow cytometry, tumorigenic potential, and cell differentiation for adipogenic, chondrogenic, osteogenic and endothelial cells were performed. It was observed that these cells had cellular plasticity and clonicity. They also had positive expressions for renal markers and negative expression for main histocompatibility complex proteins. But they did not present tumorigenic formation and had the capacity to differentiate in diverse tissues, such as adipocytes, osteocytes, chondrocytes and endothelial cells, precursors of renal vasculogenesis. Therefore, we can conclude that these new cell lines have all the necessary characteristics to become

a new model in cell therapy for cats with CKD. Among these four strains, we chose cells from metanephros at the end of the gestational period with the best characteristics among the others, since they present higher specific renal protein expression, in addition to presenting a more concise and well-established renal structure.

Keywords: Kidney. chronic renal disease. cell therapy. embryology. morphology

RESUMEN

MARIO, L. C. **Aislación, expansión y caracterización de las células progenitoras renales derivadas del mesonefro y metanefro de gato doméstico (*Felis catus*)**. [Isolamento, expansão e caracterização de células progenitoras renais derivadas de mesonefro e metanefro de gato doméstico (*Felis catus*)]. 2019. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

La enfermedad renal crónica (ERC) es ampliamente encontrada en los felinos. Se caracteriza por la deficiencia estructural y funcional de los riñones y por la pérdida gradual y definitiva del número de nefronas funcionales, con posterior reducción de la tasa de filtración glomerular. La ERC es una enfermedad de difícil tratamiento debido a las limitaciones terapéuticas existentes, que sólo minimizan los daños causados a los pacientes. La inexistencia de cualquier tratamiento específico para la ERC fortalece la necesidad de inversión en investigaciones y en terapias innovadoras aplicadas, incluyendo la terapia celular. En gatos, muchos modelos ya han estado promoviendo el uso de diversos tipos de celulares, tales como, las derivadas de la médula ósea, el amnio, y el tejido adiposo. Pero hasta el momento, ninguno de estos estudios han tenido éxito significativo en el tratamiento de esta enfermedad. Por lo tanto, observando la carencia de una terapia celular específica para la ERC, y sabiendo que muchos estudios se están realizando con el uso de células progenitoras, es decir, células que ya están destinadas a ser un tejido u órgano específico, este trabajo buscó, a través del estudio de las células derivadas del mesonefro y metanefro de gatos domésticos en diferentes etapas gestacionales, una nueva fuente para terapias celulares, a fin de probar cuál de estos diferentes tipos celulares sería el mejor para aplicaciones en las enfermedades renales. De esta forma, embriones y fetos de gato fueron recolectados de la campaña de castración electiva realizada en la ciudad de Embu das Artes, São Paulo. Los mesonefros y metanefros fueron disecados y puestos en cultivo celular. En la secuencia se realizaron pruebas de viabilidad y metabolismo celular, análisis de proteínas específicas mediante la técnica de citometría de flujo, potencial tumorigénico, y diferenciación celular para células adipogénicas, condrogénicas, osteogénicas y endoteliales. Se observó que estas

células poseían plasticidad y clonicidad celular, presentaban expresiones positivas para marcadores renales y expresión negativa para proteínas del complejo principal de histocompatibilidad, tampoco presentaron formación tumorigénica y poseían la capacidad de diferenciarse en diversos tejidos, tales como adipocitos, osteocitos, los condrocitos y las células endoteliales, precursoras de la vasculogénesis renal. Por lo tanto podemos concluir que estos nuevos linajes celulares presentan todas las características necesarias para convertirse en un nuevo modelo en terapia celular para gatos con ERC. De entre estos cuatro linajes, elegimos a las células provenientes de metanefro de final del período gestacional con las mejores características entre las demás, pues presentan mayores expresiones de proteínas específicas renales, además presentan una estructura renal más concisa y mejor establecida.

Palabras claves: Riñon. enfermedad renal crónica. terapia celular. embriología. morfología

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1:

- Figura 1 Análise macro e microscópica dos órgãos urinários de embriões e fetos de gato doméstico no início do período gestacional
- Figura 2 Análise macro e microscópica dos órgãos urinários de embriões e fetos de gato doméstico no meio do período gestacional
- Figura 3 Análise macro e microscópica dos órgãos urinários de embriões e fetos de gato doméstico no final do período gestacional
- Figura 4 Avaliação por meio de microscopia eletrônica de transmissão das estruturas presentes no mesonefro e metanefro de embriões e fetos de gato doméstico
- Figura 5 imunohistoquímica de mesonefro e metanefro de embriões e fetos de gato doméstico em diferentes fases do período gestacional

CAPÍTULO 2:

- Figura 1 Análise macro e microscópica do mesonefro e metanefro de embriões e fetos de gato doméstico
- Figura 2 Morfologia dos diferentes tipos celulares derivados de mesonefro e metanefro de embriões e fetos de gato doméstico
- Figura 3 Análise do metabolismo celular de células derivadas do mesonefro pelo colorimétrico de MTT
- Figura 4 Análise do metabolismo celular de células derivadas do metanefro pelo colorimétrico de MTT
- Figura 5 Análise através de citometria de fluxo para proteínas presentes nas células derivadas de mesonefro
- Figura 6 Análise através de citometria de fluxo para proteínas presentes nas células derivadas de metanefro
- Figura 7 Diferenciação das células derivadas de mesonefro e metanefro de gatos domésticos nas seguintes linhagens celulares: Adipogenica, Osteogenica e Condrogenica
- Figura 8 Teste tumorigênico em camundongo Balb C Nude para células derivadas de mesonefro de gato doméstico

Figura 9

Teste tumorigênico em camundongo Balb C Nude para células derivadas de metanefro de gato doméstico

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abinpet	Associação Brasileira de Indústrias de Produto para Animais de Estimação
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTMs	Células-tronco mesenquimais
CKD	Chronic Kidney Disease
DRC	Doença Renal Crônica
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EGF	Epidermal Growth Factor
ERC	Enfermedad renal crónica
FSR	Fluxo Sanguíneo Renal
HE	Hematoxilina e Eosina
IGF	Insulin-like Growth Factor
IRIS	International Renal Interest Society
MTT	Método de Redução de Tetrazólio
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PBS	Phosphate-buffered saline
PBSA	Phosphate-buffered NaCl
RPC	Relação Proteína/Creatinina
RPM	Rotação Por Minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SRD	Sem Raça Definida
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
βFGF	Basic Fibroblast Growth Factor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	24
2	OBJETIVO GERAL	25
2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1	BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO	25
3.2	DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	27
3.2.1	Características da DRC	27
3.2.2	Diagnóstico clínico da DRC	28
3.2.3	Tratamentos da DRC	29
3.3	TERAPIAS CELULARES EM GATOS.....	31
3.4	CÉLULAS-TRONCO EM GATOS.....	31
3.5	CÉLULAS PROGENITORAS RENAIIS	33
	REFERENCIAS GERAIS.....	34
4	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL DOS ÓRGÃOS URINÁRIOS COM ENFASE NAS FASES DE DESENVOLVIMENTO DO RIM EM FELIS CATUS (LINNAEUS, 1798)	40
4.1	INTRODUÇÃO	41
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.2.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA	43
4.2.2	MICROSCOPIA DE LUZ	43
4.2.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	43
4.2.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	44
4.2.5	IMUNOHISTOQUÍMICA	45
4.3	RESULTADOS	45
4.3.1	CARACTERÍSTICAS EXTERNAS GERAIS DOS EMBRIÕES E FETOS.....	45
4.3.2	ANÁLISE MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS URINÁRIOS.....	46
4.3.3	ANÁLISE ULTRAMICROSCÓPICA DE MESONEFRO E METANEFRO DE GATO DOMÉSTICO	53
4.3.4	IMUNOHISTOQUÍMICA DE MESONEFRO E METANEFRO DE GATO DOMÉSTICO.....	54

4.4	DISCUSSÃO	56
	REFERÊNCIAS	59
5	COMPARAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES ENCONTRADOS NO MESONEFRO E METANEFRO DE GATOS (FELIS CATUS, LINNAEUS, 1798)	62
5.1	INTRODUÇÃO	63
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	64
5.2.1	COLETA DO MATERIAL	64
5.2.2	DIVISÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO	65
5.2.3	ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS MESONEFROS E METANEFROS DE EMBRIÕES E FETOS DE GATO	65
5.2.4	MICROSCOPIA DE LUZ DOS MESONEFROS E METANEFROS DE EMBRIÕES E FETOS DE GATO	65
5.2.5	ISOLAMENTO, OBTENÇÃO E CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS DERIVADAS DO MESONEFRO E METANEFRO	66
5.2.6	ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DO MESONEFRO E METANEFRO	67
5.2.7	TESTE DE VIABILIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR	67
5.2.8	ENSAIO DE AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO-MTT	68
5.2.9	CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	68
5.2.10	ANÁLISE DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO DAS CÉLULAS DERIVADAS DAS ESTRUTURAS RENAI PRIMORDIAIS	69
5.2.11	DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO MESONEFRO E METANEFRO EM CÉLULAS ADIPOGÊNICAS, OSTEOGÊNICAS E CONDROGÊNICAS	69
5.3	RESULTADOS	70
5.3.1	ANÁLISE MACRO E MICROSCÓPICA DO MESONEFRO E METANEFRO DE EMBRIÕES E FETOS DE GATOS DOMÉSTICOS	70
5.3.2	ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR, DE CÉLULAS DERIVADAS DO MESONEFRO E METANEFRO DE GATO DOMÉSTICO	72
5.3.3	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR	73
5.3.4	ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA DOS DIFERENTES MEIOS MEDIANTE MÉTODO COLORIMÉTRICO-MTT	74

5.3.5	CARACTERIZAÇÃO CELULAR DE CÉLULAS DERIVADAS DO METANEFRO POR CITOMETRIA FLUXO	76
5.3.6	POTENCIAL TUMORIGÊNICO DE CÉLULAS DERIVADAS DO MESONEFRO E METANEFRO DE GATO DOMÉSTICO	80
5.3.7	DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE CÉLULAS DERIVADAS DO DESENVOLVIMENTO RENAL (MESONEFRO E METANEFRO), EM LINHAGENS ADIPOGÊNICA, OSTEOGÊNICA E CONDROGÊNICA	83
5.4	DISCUSSÃO	84
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE	93

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é amplamente encontrada em felinos (CHEW et al., 2011). É caracterizada pela deficiência estrutural e funcional dos rins e pela perda gradual e definitiva do número de néfrons funcionais, com posterior redução da taxa de filtração glomerular (POLZIN, 2005; MCGROTTY, 2008; POLZIN, 2009; BARTGES, 2012).

O diagnóstico de doença do trato urinário é realizado inicialmente pela anamnese e pelo exame físico, e confirmado mediante exames de urina, bioquímica sérica e de imagem (CHEW et al., 2011). A DRC é uma enfermidade de difícil tratamento devido às limitações terapêuticas existentes, as quais apenas minimizam os danos causados aos pacientes (RUFATO et al., 2011; POLZIN, 2013). Atualmente o tratamento da DRC consiste no manejo nutricional através da instituição de dietas específicas, correção dos distúrbios hidroeletrólíticos e ácido básicos, controle da anemia e suporte gástrico quando necessário, diminuindo assim os efeitos da doença. A inexistência de qualquer tratamento específico para a DRC fortalece a necessidade de investimento em pesquisas em terapias inovadoras aplicadas, incluindo a terapia celular (BASTOS E KIRSZTAJN, 2011).

Diversos estudos vêm sendo realizados com foco na caracterização de células progenitoras renais, ou derivadas de outros órgãos e tecidos, no sentido de observar sua viabilidade e posterior aplicação em terapias celulares experimentais. Em gatos, já foram objeto de estudo por exemplo, as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e do âmnio (MARTIN et al., 2002; CARDOSO et al., 2014; VIDANE et al., 2016), as células renais e cerebrais (JIMENEZ et al., 2001) e as células derivadas do tecido adiposo (SANTOS, 2012; QUIMBY et al., 2013).

Observando a carência de uma terapia celular específica para a DRC, e ainda a alta incidência desta doença nos felinos, este trabalho busca, por meio do estudo das células derivadas do mesonefro e metanefro de gatos domésticos, trazer novas informações referentes ao cultivo, diferenciação e caracterização deste tipo celular, o que poderia permitir novas opções de tratamento para a doença renal crônica na espécie.

2. OBJETIVO GERAL

Descrever o desenvolvimento do sistema urinário no gato, visando estabelecer o melhor período para a obtenção de células indiferenciadas que poderiam ser caracterizadas e diferenciadas em células derivadas do mesonefro e metanefro de gatos. As células do mesonefro e do metanefro apresentam maior capacidade em se desenvolver em células glomerulares e tubulares, apresentando assim um melhor potencial para interagir ou reconstituir estruturas essenciais às funções renais durante as DRC.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o desenvolvimento do sistema urinário com ênfase nas estruturas renais.
- Avaliar em qual dia gestacional surgem e regridem as principais estruturas do desenvolvimento renal.
- Avaliar os tipos celulares presentes no mesonefro e metanefro mediante análise ultraestrutural.
- Caracterizar morfologicamente os tipos celulares existentes.
- Avaliar o potencial tumorigênico presente nessas células.
- Caracterizar por meio de citometria de fluxo as proteínas presentes nessas células.
- Verificar o potencial de diferenciação dessas células em linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

Para a totalidade do desenvolvimento embrionário e fetal dos gatos domésticos são descritos 22 estágios ou fases, que têm início na blastogênese e término no nascimento propriamente dito (KNOSPE, 2002). A gestação dos gatos domésticos dura em média 63 dias, dos quais os 28 primeiros correspondem ao período

embrionário e, do 29º dia até o parto, ao período fetal. A implantação embrionária ocorre entre o 12º e o 14º dias de gestação (KEHRER 1973). Trata-se de uma espécie considerada polítoca, gerando em média 4 filhotes por gestação (EVANS, SACK, 1973; FOX et al., 1984).

Responsável pela produção da urina a partir da filtração do sangue, o rim é um órgão fundamentalmente importante no contexto do sistema urinário. Aos 15 dias do desenvolvimento embrionário, surge o rim primitivo, denominado pronefro e que não é funcional em mamíferos. Aos 19 dias, o rim evolui para a fase de mesonefro, cuja funcionalidade ocorre apenas durante um estágio do desenvolvimento embrionário, regredindo em sequência. Aos 52 dias de gestação os fetos apresentam o rim em sua fase de metanefro, comportando todas as suas estruturas definitivas estabelecidas (ABREU et al., 2011).

Nos animais domésticos, a formação e o desenvolvimento renal são denominados nefrogênese. As estruturas primordiais dos rins surgem do mesoderma intermediário durante a diferenciação da nefrogênese. Esta diferenciação ocorre no broto urogenital onde as estruturas primordiais dos rins o pronefro, ou rim primitivo, é derivado do cordão nefrogênico, que se desenvolve do sétimo ao décimo quarto somitos, localizados na região cranial do embrião. O mesonefro, ou rim intermediário, tem sua origem caudal, no nono ao vigésimo sexto somitos. O mesonefro atua, ou seja, funciona como rim até o estabelecimento do rim definitivo. As células existentes no cordão nefrogênico se desenvolvem em vesículas mesonéfricas, as quais em seguida formam o túbulo mesonéfrico. Os ductos mesonéfricos se expandem cranialmente até estabelecer contato com o ducto pronéfrico. A margem medial dos túbulos se expande, formando uma parede dupla, que é preenchida por capilares sanguíneos, a cápsula glomerular. No interior da cápsula, o enovelado de vasos sanguíneos é então denominado glomérulo, e corresponde à porção intermediária do túbulo mesonéfricos. Esses túbulos se alongam rapidamente nos sentidos cranial e caudal, formando uma estrutura alongada. Por fim, se estabelece o metanefro, ou rim propriamente dito, cujo desenvolvimento ocorre na região entre o vigésimo sexto e vigésimo oitavo somitos. O metanefro se origina de dois tecidos diferentes do broto uretérico e do blastema metanéfrico. O broto uretérico, derivado do ducto mesonéfrico, dá origem aos túbulos coletores, pelve renal e ureter in situ (SADLER 2005; MOORE, 2008; HYTTTEL et al., 2012).

3.2 DOENÇA RENAL CRÔNICA

3.2.1 Características da DRC

A DRC tem alta incidência em felinos, sendo a segunda maior causa de mortalidade em gatos (KING et al., 2007; POLZIN, 2007; CHEW et al., 2011). Acomete principalmente animais idosos, mas pode se manifestar em animais de qualquer idade (LEES, 2004; BARTGES, 2012; BANFIELD, 2017).

No geral, as doenças renais afetam os glomérulos, os túbulos contorcidos, proximal e distal, o tecido intersticial e os vasos sanguíneos renais. São doenças que podem ter origem hereditária/congênita, infecciosa, tóxica (toxinas endógena ou exógena), ou primariamente imunomediadas, decorrentes de desequilíbrios eletrolíticos (hipercalcemia e hipocalemia no felino) e traumas (POLZIN, 2009).

O termo DRC é utilizado quando a lesão renal se prolonga por, no mínimo, três meses. É uma doença degenerativa, caracterizada pela deficiência estrutural e funcional dos rins, com perda gradual e definitiva da quantidade de néfrons funcionais, ao mesmo tempo em que é também possível ser observada redução na taxa glomerular (POLZIN, 2005; MCGROTTY, 2008; POLZIN, 2009; BARTGES, 2012). O rim é um órgão de múltiplas funções orgânicas (excretora, regulatória e biossintética), e, para preservar a homeostase não é necessária a presença do número original de néfrons, mas de quantidade suficiente para manter as suas funções. A falência renal retrata a disfunção máxima do órgão (POLZIN et al., 2005).

Para uma melhor abordagem da DRC, a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS), desde 2006, traz uma abordagem clínica da doença segundo os seus estágios de evolução, visto que seu caráter progressivo é proporcional a gravidade da doença (POLZIN, 2009). Segundo a IRIS, a DRC pode ser classificada em quatro estágios, de acordo com as concentrações séricas de creatinina (POLZIN et al., 2005; SANDERSON, 2009). Essa classificação considera os estágios da doença de acordo com o tempo de evolução e a presença de marcadores de lesão renal (IRIS, 2016).

O estágio I da DRC é caracterizado pelo estado não azotêmico, com presença de poucas alterações renais, tais como a baixa concentração urinária e a proteinúria. O estágio II se caracteriza por uma discreta azotemia e pelo aumento na variação de creatinina, de 1,6 mg/dL-1 a 2,8 mg/dL-1 em gatos. O estágio III define a azotemia em grau moderado, com índices de creatinina sérica variando entre 2,9 mg/dL-1 e 5,0

mg/dL-1 em gatos, além de perda da função renal. No estágio IV a azotemia é intensa (creatinina sérica superior a 5,0mg/dL-1) e a perda da função renal se instala (POLZIN et al., 2005). Existem sub-estágios para a DRC, que são caracterizados por proteinúria e hipertensão arterial sistêmica, fatores que independem da progressão da DRC (LEES et al., 2004; GRAUER, 2007; BACIC et al., 2010). Estes fatores estão diretamente ligados no prognóstico da doença (POLZIN et al., 2009). A classificação dos diferentes estágios da DRC auxilia para o estabelecimento de condutas terapêuticas apropriadas, uma vez que se baseiam na fisiopatologia de cada fase da DRC e na experiência clínica (ELLIOTT E WATSON 2009).

3.2.2 Diagnóstico clínico da DRC

O diagnóstico clínico da DRC tem início com a avaliação das manifestações clínicas gerais. A anamnese pode auxiliar na suspeita diagnóstica inicial, com histórico de poliúria, polidipsia, emagrecimento progressivo, hiporexia, entre outros. A avaliação clínica é complementada pelo exame físico do paciente, quando são avaliados sinais relativos à hidratação, coloração da mucosa oral (em busca de palidez sugestiva de anemia) ou ulcerações orais características de uremia avançada. A halitose urêmica também é considerada na avaliação física. A presença de urina armazenada em grande quantidade na vesícula urinária, em um animal desidratado, é sugestiva de incapacidade de concentração urinária e, conseqüentemente, de alteração da função renal. A palpação dos rins auxilia na investigação sobre seu tamanho (maior ou menor que o normal), contornos (liso ou irregular), textura (rigidez ou maciez), e ainda quanto a presença de dor. Nos gatos, ambos os rins são palpáveis, e rins pequenos, rígidos e de contornos irregulares são sugestivos de DRC (ETTINGER, 2004).

Porém, é através da realização de exames laboratoriais que a função renal pode ser avaliada quanto a taxa de filtração glomerular (TFG), por exemplo, e que está diretamente relacionada à massa funcional renal. A TFG é o principal índice para avaliação da função renal. O fluxo sanguíneo renal (FSR) também é averiguado. Por se tratar de exames complexos, muitas vezes são substituídos pela mensuração das taxas de ureia sanguínea e creatinina sérica, que juntamente com a densidade urinária podem indicar alterações na filtração renal (CHEW et al., 2011). Outros exames importantes para estabelecimento de um diagnóstico assertivo para DRC incluem a

mensuração do fósforo e do cálcio séricos, hemogasometria, hemograma completo, relação proteína-creatinina-urinária e nível de pressão arterial sistólica (IRIS, 2016).

3.2.3 Tratamentos da DRC

A DRC, é uma enfermidade de difícil tratamento, devido às limitações terapêuticas existentes, cujas abordagens apenas conseguem minimizar os danos causados aos pacientes (KING et al., 2007; RUFATO et al., 2011, POLZIN, 2013). Os atuais tratamentos estão baseados nos diferentes estágios da DRC, podendo diminuir a velocidade de progressão da doença e contribuindo para a melhoria da qualidade de vida dos animais acometidos (WAKI et al., 2010).

Quanto mais cedo a DRC for diagnosticada, melhor será o efeito do tratamento e, consequentemente, a sobrevida do animal (BASTOS E KIRSZTAJN, 2011). Durante primeiro estágio a ausência de azotemia demanda apenas a hidratação, instituindo fluidoterapia com solução cristalóide. A proteinúria, que pode ocorrer em qualquer estágio da DRC, é confirmada pelo teste da relação entre proteína/creatinina (RPC) na urina, um indicador de lesão glomerular em ausência de sinais clínicos ou laboratoriais específicos do rim.

A terapia tem o intuito de modular a pressão intra-glomerular lançando mão de inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), reduzindo os valores de proteinúria a pelo menos 50% do valor inicial da magnitude observada (POLZIN, 2009). A pressão arterial deve ser mensurada com frequência e os tratamentos com bloqueadores do canal de cálcio, como anlodipino, deve ser instituído nos casos em que a pressão arterial sistólica permanece acima de 160 mm Hg (IRIS, 2016).

No estágio II, a desidratação pode decorrer da diminuição na ingestão de água ou pela perda de água em processos gastrentéricos (POLZIN, 2009). É possível detectar alterações dos fatores de progressão da doença renal, como hipertireoidismo secundário, acidose metabólica, e especialmente em felinos, a hipocalcemia. A retenção de fósforo no sangue ocorre de forma gradativa devido à diminuição progressiva da taxa de filtração glomerular. Especificamente nos felinos pode ser observado o aumento na concentração sérica de paratormônio, mesmo quando as concentrações séricas de fósforo estão normais (CHEW, 2011). Neste estágio da DRC, as concentrações séricas de fósforo devem ser mantidas abaixo de 4,5 mg/dL-1, o que pode ser obtido com a instituição de uma dieta hipofosfórica (ELLIOTT, 2006;

POLZIN, 2007). Ainda, a acidose metabólica é observada, como decorrência do comprometimento renal na excreção de ácidos, reabsorção de bicarbonato (HCO_3) e ainda pelo processo de amoniagênese renal (POLZIN et al., 2009). Dessa forma, é indicado determinar o valor do bicarbonato sanguíneo para estabelecimento de medidas terapêuticas apropriadas. Os felinos desenvolvem a acidose em estágios precoces, quando comparados aos cães, devido a sua maior capacidade de absorção renal de bicarbonato (POLZIN et al., 1995; POLZIN et al., 2000).

No estágio III, as alterações laboratoriais encontradas nos estágios I e II ocorrem de forma mais severa. A desidratação é crônica, não mais aguda. Os rins apresentam comprometimento importante da função tubular de reabsorção de água, acarretando em lesão renal por má perfusão, decorrente de diversas causas de desidratação (vômito, diarreia, febre, estresse, entre outros). A desidratação é responsável por: prostração, fraqueza, constipação (principalmente em felinos) e perda de apetite. Assim, é primordial tratar instituir fluidoterapia de manutenção, via parenteral (subcutânea) com uso de cristaloides. (POLZIN et al., 2005; MAY E LANGSTON, 2006; POLZIN, 2007). A anemia deve ser monitorada por meio de hemogramas e contagem de reticulócitos, e a terapia com eritropoietina deve ser instituída, associada a reposição de ferro, nos casos em que o hematócrito permanecer abaixo de 20%, sem resposta a reposição de ferro e nos casos de anemia sintomática (ELLIOTT E WATSON 2009; CHALHOUB et al., 2011).

A evolução final da DRC compreende o estágio IV, fase em que o número de néfrons é muito reduzido. A manifestação clínica é mais acentuada e também menos responsiva à terapia (POLZIN, 2009; ELLIOTT E WATSON 2009). O tratamento para a acidose metabólica e a anemia seguem as mesmas recomendações descritas para o estágio III. A oligúria e a hipercalemia podem ser observadas nessa fase, e a crise urêmica pode ser mais evidente. É uma fase em que a hemodiálise é recomendada, porém, tendo em mente que seu efeito é somente temporário, pois haverá novo acúmulo de toxinas urêmicas, uma vez que os néfrons remanescentes não são capazes de restabelecer a adequada função renal. Devido ao contexto no qual os tratamentos para DRC se inserem, as terapias celulares devem ser buscadas com o intuito de promover avanços nesta área, tais como tratamentos definitivos para esta doença.

3.3 TERAPIAS CELULARES EM GATOS

A terapia celular vem sendo estudada há décadas, visando trazer melhorias para o tratamento das diversas doenças existentes. O termo engenharia tecidual é utilizado para definir a engenharia biológica, a biologia das células-tronco e a biologia molecular, que auxiliam na medicina regenerativa. O cultivo de células é um componente fundamental para a engenharia tecidual, sendo o uso de células-tronco muito promissor para as novas pesquisas. O uso de células-tronco na Medicina Veterinária está ganhando mais espaço, e agregando novos conhecimentos à medicina regenerativa (MAHLA, 2016).

Em medicina veterinária, tem-se utilizado para pesquisa com terapias celulares camundongos, ratos, gatos, cães, cavalos, ovelhas e cabras, principalmente, pelo isolamento de células da medula óssea, tecido adiposo, funículo umbilical e fluído amniótico (LEES, 2005; BRUNELLI et al., 2007; REBELLATO et al., 2008; TOGNOLI, et al., 2009; OLIVEIRA, 2014).

O uso de células-tronco mesenquimais em grande escala deve-se à plasticidade destas células para originar tecidos mesodermis e não mesodermis, produzindo assim vários tipos celulares que necessitem de reparo. Estas células são utilizadas de um modo geral para pesquisas com humanos e animais (MARTINS et al., 2014).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) estão presentes em todos os tecidos adultos, incluindo a medula óssea, o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos. Por ser o tecido mais utilizado e caracterizado para estudo das propriedades das células-tronco e por ter sido o primeiro empregado em terapia celular, a medula óssea é um dos principais tecidos para obtenção de CTMs. Os progressos com esse tipo celular ainda continuam sendo descritos, trazendo inúmeras abordagens nas diversas áreas de reparações teciduais existentes (PINTO FILHO et al., 2013).

3.4 CÉLULAS-TRONCO EM GATOS

Para realização de novas terapias celulares, muitos estudos vêm sendo preconizados com o intuito de caracterizar novas linhagens celulares, observando assim suas características morfológicas, pré-disposição em formação de tumores, e

sua plasticidade em se diferenciar em diversos tecidos, com o intuito de utilizá-las em pesquisas inovadoras nesta área. Em gatos, inúmeras células já foram estudadas, tais como as células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea e do tecido adiposo. Estas células apresentam um alto potencial proliferativo em cultura, alta capacidade de diferenciação nos diversos tipos celulares existentes, além de um excelente potencial terapêutico (MARTIN et al., 2002; QUIMBY et al 2011; SANTOS, 2012; QUIMBY et al., 2013).

No estudo de Quimby e colaboradores, (2011), foi realizada uma injeção de células oriundas da medula óssea e tecido adiposo, em gatos com DRC através de injeção intra-renal unilateral guiada por ultrassom, a TFG foi mensurada mediante cintilografia nuclear antes da aplicação celular e após 30 dias da mesma, foi observado para alguns animais uma discreta melhora nos níveis de creatinina séricos, porém apesar dos benefícios apresentados pela técnica, como o animal já se encontra debilitado devido a agressividade da doença, indica-se buscar uma via de aplicação celular alternativa, a qual não cause maiores danos aos animais.

Seguindo os estudos clínicos com estes tipos celulares, Quimby et al., (2013), investigou a ação de células criopreservadas em relação as células cultivadas e suas ações após serem injetadas intravenosamente em pacientes com DRC. Foi observado que a administração de células criopreservadas apresentaram melhoras significativas nos níveis de creatinina e da TFG, porém esses animais apresentaram muitas reações adversas a essa técnica. Já os animais que receberam células cultivadas oriundas do tecido adiposo, não apresentaram efeitos colaterais da técnica, porém também não apresentaram diferenças significativas em relação a melhora da doença.

Outra linhagem celular estudada nos felinos é a célula mesenquimal derivada do âmnio fetal. Estas células apresentam características morfológicas e fenotípicas de células mesenquimais, representando fontes promissoras com terapias celulares. (CARDOSO et al., 2014; VIDANE et al, 2016). No estudo desenvolvido por Vidane e colaboradores (2016), gatos com DRC receberam células-tronco oriundas de âmnio de gato doméstico por via intra-renal guiada por ultrassom em ambos os rins por duas vezes. Após o tratamento, foi observado que os animais apresentaram melhoras nos níveis de creatinina, porém nenhuma alteração na arquitetura renal foi observada, portanto podemos concluir as células tronco derivadas de âmnio de gato doméstico

apresentam efeitos paliativos, fornecendo um melhor bem-estar aos animais, porém não foram observados progressos significativos no tratamento para as DRC.

Todos os estudos citados acima vêm nos fornecer subsídios para que continuamos na pesquisa com as terapias celulares, até o presente momento não foi possível obter um tratamento eficaz para essas doenças, porém esses estudos são bases para continuarmos pesquisando melhores modelos ou novas fontes alternativas de células para encontrarmos melhores prognósticos a essa enfermidade.

3.5 CÉLULAS PROGENITORAS RENAIIS

Atualmente muito se tem investido em estudos com terapias celulares provenientes de células progenitoras, diversas pesquisas têm mostrado que essas células apresentam melhores resultados quando comparados aos demais tipos de células-tronco, isto se deve pelo fato que essas células já são predestinadas a formação de um determinado órgão ou linhagem celular específica de um tecido (AGGARWAL et al., 2013).

Estudos recentes mostraram que todas as células progenitoras renais testadas apresentaram capacidade de resistência aos danos apoptóticos e conseguiram proliferar-se em condições em que o tecido se encontrava com danos renais. E quando as mesmas foram injetadas *in vivo*, elas contribuíram para o reparo da lesão e quando as células progenitoras tubulares foram transplantadas para um metanéfrio, elas conseguiram se integrar em componentes epiteliais presentes no néfron (MAESHIMA et al., 2003; DEKEL et al., 2006; MAESHIMA et al., 2006; KINOMURA et al., 2008; LANGWORTHY et al., 2009).

Pelekanos e colaboradores (2012), estudaram as semelhanças apresentadas entre células-tronco oriundas da medula-óssea em relação as células progenitoras de órgãos específicos tais como rim e coração. Todas as populações apresentaram morfologia clássica de células-tronco mesenquimais, com multipotencialidade e plasticidade celular *in vitro*. Também foram comparados o nível de imunofenotipagem dessas populações celulares, ambas apresentaram valores elevados para marcadores mesenquimais assim como a nível de expressão gênica ambas as linhagens apresentaram aproximadamente 66% dos genes na rede de pluripotência. Por fim, foi observado também por expressão genica, que mesmo com as diversas semelhanças a níveis moleculares, as células progenitoras dos órgãos específicos

apresentaram melhores atividades para a via que elas estavam predestinadas, sugerindo assim que elas apresentariam melhores funções para o órgão destinado. No estudo realizado por Rosines et al. (2007), foi observado que células epiteliais cultivadas a partir do túbulo néfrico conseguiram sofrer brotamento *in vitro* e na sequência foram isoladas e recombinadas com mesênquima metanéfrico. A implantação do tecido recombinado resultou em uma vascularização precoce, ou seja, uma estrutura tubular epitelial não ramificada (potencialmente construída a partir de células cultivadas), pode ser induzida a formar tecido renal de tal modo que este seja capaz de ser implantado em ratos hospedeiros e desenvolver glomérulos com evidência de vascularização precoce.

REFERENCIAS GERAIS

AGGARWAL, S.; MOGGIO, A.; BUSSOLATI, B. Concise review: stem/progenitor cells for renal tissue repair: current knowledge and perspectives. **Stem cells translational medicine**, v. 2, n. 12, p. 1011-1019, 2013.

ABREU, D. K. et al. Estudo microscópico e macroscópico, com enfoque radiográfico e de alizarina, no desenvolvimento embrionário e fetal de gatos domésticos (*Felis catus*) em diferentes idades gestacionais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. a00101s1, p. 57-66, 2011.

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. **Jornal brasileiro de nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 93-108, 2011.

BACIC, A. et al. Evaluation of albuminuria and its relationship with blood pressure in dogs with chronic kidney disease. **Veterinary clinical pathology**, v. 39, n. 2, p. 203-209, 2010.

BARTGES, J. W. Chronic kidney disease in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 42, n. 4, p. 669-692, 2012.

BANFIELD. 2017. Banfield Pet Hospitalar. Kidney Disease. Disponível em: <https://www.banfield.com/our-hospitals/hospital-locations?ll=-23.5715938,-46.742553499999985&q=05362-020>. Acesso: 15 janeiro de 2017.

BRUNELLI, A. T. J et al. Transplante autólogo de células-tronco do limbo esclerocorneal em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte**, v. 59, n. 5, p. 1194-1204, 2007.

CARDOSO, M. T. et al. A melhor fonte de células-tronco: o âmion do cão e do gato. **Acta Vet. Brasilica**, v. 8, n. 2, p. 269-274, 2014.

CHALHOUB, S.; LANGSTON, C. E.; EATROFF, A. Anemia of renal disease: what it is, what to do and what's new. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 13, n. 9, p. 629-640, 2011.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. **Urologia e nefrologia do cão e do gato**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 540 p. 2011.

DEKEL, B. et al. Isolation and characterization of nontubular sca-1+ lin- multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 12, p. 3300-3314, 2006.

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

ELLIOTT, D.; LEFEBVRE, H. Chronic renal disease: the importance of nutrition. **PIBOT, P. et al. Encyclopedia of canine clinical nutrition. France: Edta. Aniwa SAS on behalf of Royal Canin**, p. 252-282, 2006.

ELLIOTT, J.; WATSON, A. D. J. Chronic kidney disease: staging and management. **Kirk's current veterinary therapy**, p. 883-892, 2009.

ETIINGER, J. S.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**: v. 2, Insuficiência Renal Crônica, 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 2, n. 1, p. 11-45, 1973.

FOX, J. G.; COHEN, B. J; LOEW, F. M. **Laboratory Animal Medicine**. Orlando: Academic Press, 1984.

GRAUER, G. F. Measurement, interpretation, and implications of proteinuria and albuminuria. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 37, n. 2, p. 283-295, 2007.

HYTTEL, P.; SINOWATZ F.; VEJLSTED M. **Embriologia veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2012, p. 252-285.

IRIS- International Renal Interest Socyety. 2016. **Treatment Recommendations for CKD in cats 2015**. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/pdf/treatment-recommendation-cats.pdf> . Acesso em: 16 janeiro de 2017.

JIMENEZ, J. J. et al. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. **British journal of haematology**, v. 112, n. 1, p. 81-90, 2001.

KEHRER, A. Zur entwicklung und ausbildung des chorions der placenta zonaria bei katze, hund und fuchs. **Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, v. 143, n. 1, p. 25-42, 1973.

KING, J. N. et al. Prognostic factors in cats with chronic kidney disease. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 21, n. 5, p. 906-916, 2007.

KINOMURA, M. et al. Amelioration of cisplatin-induced acute renal injury by renal progenitor-like cells derived from the adult rat kidney. **Cell transplantation**, v. 17, n. 1-2, p. 143-158, 2008.

KNOSPE, C. Periods and stages of the prenatal development of the domestic cat. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2002.

LANGWORTHY, M. et al. NFATc1 identifies a population of proximal tubule cell progenitors. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 2, p. 311-321, 2009.

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

LEES, G. E. et al. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). **Journal of veterinary internal medicine**, v. 19, n. 3, p. 377-385, 2005.

MAHLA, R. S. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. **International journal of cell biology**, v. 2016, p. 1-24, 2016.

MAESHIMA, A.; SAKURAI, H.; NIGAM, S. K. Adult kidney tubular cell population showing phenotypic plasticity, tubulogenic capacity, and integration capability into developing kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 1, p. 188-198, 2006.

MAESHIMA, A.; YAMASHITA, S.; NOJIMA, Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 12, p. 3138-3146, 2003.

MAY, S. N.; LANGSTON, C. E. Managing chronic renal failure. **Compendium**, 2006.

MARTIN, D. R. et al. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental hematology**, v. 30, n. 8, p. 879-886, 2002.

MARTINS, J. P. et al. Towards an advanced therapy medicinal product based on mesenchymal stromal cells isolated from the umbilical cord tissue: quality and safety data. **Stem cell research & therapy**, v. 5, n. 1, p. 9, 2014.

MCGROTTY, Y. Diagnosis and management of chronic kidney disease in dogs and cats. **In Practice**, v. 30, n. 9, p. 502, 2008.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 7. ed. *Editora*: Elsevier, 2008. p. 251-264.

OLIVEIRA, V. C. et al. Stem cells derived from bone marrow and preclinical trials in Veterinary Medicine. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 21, n. 3, 2014.

PELEKANOS, R. A. et al. Comprehensive transcriptome and immunophenotype analysis of renal and cardiac MSC-like populations supports strong congruence with bone marrow MSC despite maintenance of distinct identities. **Stem cell research**, v. 8, n. 1, p. 58-73, 2012.

PINTO, F. et al. Adult mesenchymal stem cells: characteristics and experimental use in animals. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. Special edition, p. 49-59, 2013.

POLZIN D. J. **Chronic kidney disease**. In: Ettinger S, Feldman E, editors. Textbook of veterinary internal medicine. London: Saunders Elsevier, p. 2036–67. 2010.

POLZIN, D. J. 11 Guidelines for conservatively treating chronic kidney disease. **Veterinary Medicine**, peer-reviewed, p.788- 799, 2007.

POLZIN, D.J. et al. Chronic kidney disease. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of veterinary internal medicine**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2005. p.1756-1785.]

POLZIN, D.J. **Diagnosing & staging kidney disease in dogs and cats**, 2008. Disponível em: <www.chicagovma.org/pdfs/ceprograms/CVMA%20Notes.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2009.

POLZIN, D.; OSBORNE, C. **Conservative medical management of chronic renal failure**. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. Canine and feline nephrology and urology. New York: Williams & Wilkins, 1995. p.505-507.

POLZIN, D. J. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, p. 1-11, 2013.

POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A.; BARTGES, J.W. Chronic renal failure. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 5.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p.1634-1662. 2000

QUIMBY, J. M. et al. 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, 2011.

QUIMBY, J. M. et al. 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 & therapy**, v. 4, n. 2, p. 48, 2013.

REBELATTO, C. K. et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 7, p. 901-913, 2008.

ROSINES, E. et al. Staged in vitro reconstitution and implantation of engineered rat kidney tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 52, p. 20938-20943, 2007.

RUFATO, F. H. F; REZENDE-LAGO, N. C. M.; MARCHI, P. G. F. Insuficiência renal em cães e gatos. **Revista Eletrônica da Univar, Barra do Garças**, v. 6, p. 167-173, 2011.

SANDERSON, S. L. Measuring glomerular filtration rate: practical use of clearance tests. **Kirk's Current Veterinary Therapy. Philadelphia, Saunders**, 2009. p 872-879

SADLER, T.W. Langman Embriologia Médica. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.3-77, 2005.

SANTOS, Juliana Passos Alves dos. 2012. **Terapia celular em gatos portadores de doença renal crônica: avaliação laboratorial e imagiológica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TOGNOLI, G. K. et al. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, 2009.

VIDANE, A. S. et al. Transplantation of amniotic membrane-derived multipotent cells ameliorates and delays the progression of chronic kidney disease in cats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 316-326, 2017.

WAKI, M. F. et al. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos: abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciência rural**, v. 40, n. 10, 2010.

4. CAPITULO 1:

Desenvolvimento embrionário e fetal dos órgãos urinários com ênfase nas fases de desenvolvimento do rim em *Felis catus* (Linnaeus, 1798)

Lara C. Mario¹ | Maiara P. Moraes¹ | Jessica Borghesi¹ | Phelipe O. Favaron¹ |
Franceliusa D. Oliveira¹ | Adriana R. A. Anunciação¹ | Rafael G. Agopian² |
Samirah A. Gomes³ | Maria A. Miglino¹

¹ Setor de Anatomia dos animais domésticos e silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo FMVZ/USP, São Paulo, Brasil.

²Setor de Anatomia dos animais domésticos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de Santo Amaro UNISA, São Paulo, Brasil.

³ Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo FM/USP, São Paulo, Brazil
Autor correspondente: Lara C. Mario, Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, 05508-270, Butantã, São Paulo, Brazil.

Email: laracarolina-mario@hotmail.com

Editor de Revisão: Perry George

Financiamento: CAPES; FAPESP

RESUMO: A origem embrionária do sistema urogenital provém da mesoderme intermediária a qual forma maior parte dos órgãos urinários. A formação do rim apresenta três fases sucessivas: o pronefro, o mesonefro e o metanefro. Devido à falta de conhecimentos específicos sobre este sistema em gatos, este trabalho objetivou descrever o desenvolvimento dos órgãos urinários tendo como principal foco as estruturas específicas presentes no pronefro, mesonefro e metanefro durante as fases do desenvolvimento embrionário e fetal. Foram utilizadas as técnicas de microscopia de luz, imunohistoquímica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão nos embriões e fetos provenientes de 12 fêmeas gestantes de gatos domésticos sem raça definida (SRD), em diferentes fases gestacionais para descrever as estruturas propostas. O pronefro é encontrado no início do desenvolvimento embrionário, em embriões de 15 a 19 dias com presença de corpúsculos pronéfricos, ductos pronéfricos e túbulos pronéfricos, o mesonefro é encontrado entre os dias 17 a 37 com ductos mesonéfricos, túbulos mesonéfricos e

glomérulos e o metanefro é o rim definitivo e funcional, sendo observado a partir de 21 dias gestacionais com presença de glomérulos e túbulos contorcidos distais e proximais, aos 37 dias gestacionais a região corticomedular já está diferenciada e os 50 dias gestacionais todas as estruturas já estão formadas. As análises auxiliam em futuros tratamentos de doenças relacionadas a este sistema e consequentemente aumentam o conhecimento necessário para seu entendimento.

Palavras-chave: organogênese; sistema urinário; gato; rim

4.1. INTRODUÇÃO

As doenças renais são a segunda maior causa de mortalidade em gatos. Entre as principais doenças renais, podemos citar a doença renal policística, insuficiência renal crônica, cistite idiopática felina, entre outras. Todas as doenças relacionadas ao sistema podem evoluir para uma insuficiência renal e, consequentemente, uma falência renal (KING et al., 2007; POLZIN, 2007; CHEW et al., 2011).

Segundos dados apresentados pela Associação Brasileira de Indústrias de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet), em 2013, a sociedade gastou em média 15,2 bilhões com a saúde dos pets no país. O Brasil conta com uma população de 21,3 milhões de gatos, sendo o segundo maior mercado do mundo de animais de estimação (DE COMUNICAÇÃO, 2015).

De acordo com a American Human Association em 2012, as doenças renais em felinos estão entre as mais vistas nas clínicas veterinárias e a causa mais comum de morte em gatos idosos é a doença renal crônica; um a cada doze gatos possuem essa afecção. A rede de hospitais veterinários Banfield dos Estados Unidos apresentou dentre todos os pacientes atendidos em 2010, 1,5% de pacientes diagnosticados com doença renal crônica, destes, 81% apresentavam idade igual ou superior a 10 anos. É relevante ressaltar que comparando os dados de 2006 a 2011, os casos dobraram, de 80 mil para 160 mil (LEFEBVRE, 2011).

O sistema urinário é composto pelos rins, ureteres, bexiga e uretra, os quais, em conjunto, atuam na composição, regulação e excreção dos fluidos metabólicos. Assim sendo, a função dos órgãos urinários consiste na remoção de resíduos, mediante a formação da urina, além de promover a homeostase no organismo através da remoção e conservação de eletrólitos, água, glicose e proteínas (DYCE et al., 2010).

A origem embrionária do sistema urogenital provém da mesoderme intermediária, situada entre os somitos e a mesoderme lateral (ALMEIDA, 1999). Os túbulos renais apresentam características próprias e surgem três sistemas renais sucessivos com rápida superposição cronológica: o pronefro, o mesonefro e o metanefro (GARCIA E FERNÁNDES, 2009).

O pronefro é constituído por aglomerados celulares situados na região cervical (HYTTEL et al., 2012). Precocemente, o pronefro degenera e todos os indícios do sistema pronéfrico também, mas a maior parte de seus ductos é utilizada pelo mesonefro, que o sucede. À medida que o sistema pronéfrico degenera, começam a surgir os primeiros túbulos mesonéfricos (SAINIO E AHOKAS, 2003). De acordo com Garcia e Fernández (2009), em gatos, parece existir certa funcionalidade do mesonefro durante a vida fetal. No caso dos gatos domésticos, aos 19 dias gestacionais, o mesonefro já está formado, sugerindo que o pronefro se desenvolve e regride rapidamente no início do período embrionário.

O metanefro, o rim permanente, inicia seu desenvolvimento enquanto o mesonefro regride. O metanefro é o rim definitivo (HYTTEL et al., 2012). Os rins que, no início, se localizam na região pélvica, migram cranialmente de forma gradual atingido o abdômen. O alongamento da porção inicial de seu ducto forma o ureter. Em fetos com 52 dias de idade, o metanefro já está bem estabelecido, com a presença das regiões cortical e medular além de estruturas bem delimitadas (ABREU et al., 2011).

Diante do exposto, objetivou-se ampliar o conhecimento da embriologia do sistema urinário em gatos pela descrição detalhada dos seus principais componentes e, assim, construir melhor conhecimento para compreensão anatomopatológica do desenvolvimento de muitas doenças, pela importância econômica dos gatos e ainda proporcionar subsídio científico e análises que darão apoio no tratamento das doenças relacionadas ao sistema urinário e, consequentemente, no bem-estar animal.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 12 fêmeas gestantes de gatos domésticos sem raça definida (SRD), em diferentes fases gestacionais a fim de observar o desenvolvimento embrionário dos órgãos urinários. Os animais foram provenientes de campanhas de castração. Este trabalho está de acordo com as normas do comitê de bioética da

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Nº 9798110215).

4.2.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

As idades dos embriões e fetos foram estimadas segundo suas medidas pelo método de crown-rump e suas características externas descritas por Evans e Sack (1973) com adaptações confrontando dados dos autores Knospe (2002), Abreu et al. (2011) e Pieri et al. (2015).

4.2.2 MICROSCOPIA DE LUZ

Os embriões e fetos foram fixados em solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5%. Após a fixação o material foi desidratado em uma série crescente de etanol (70% a 100%), seguido de diafanização em xilol, e embebidos em parafina (Histosec) (TOLOSA et al., 2003).

Os blocos foram cortados em micrótomo automático (Leica, RM2165, Germany) obtendo-se cortes de 5 µm, os quais foram aderidos em lâminas histológica. Após serem desparafinizados, os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina e em Ácido periódico de Shiff. Em seguida, as lâminas foram analisadas e as características morfológicas fotodocumentadas através de microscópio Nikon Eclipse 80i.

4.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada nas amostras dos fragmentos dos rins, as quais foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, seguido uma serie de desidratação crescente em álcool (70% à 100%). As estruturas foram fixadas em stubs, desidratadas à seco em ponto crítico (Balzers CPD 020), e metalizadas em ouro ("sputtering" Emitech K550). Os resultados foram analisados através do microscópio eletrônico ME Leo 435 VP.

4.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para a análise ultraestrutural, fragmentos com cerca de 0,5 cm² foram obtidos de diferentes regiões dos metanefros e mesonefros. Estes foram fixados em glutaraldeído a 2,5%, tamponado com fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,4. Após completar a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,4. Logo após, foi realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% por duas horas. Após este procedimento, os fragmentos foram lavados em solução tampão por três vezes durante 10 minutos cada. Em seguida, foram imersos por uma hora em acetato de uranila aquosa saturada, lavados em tampão e submetidos à desidratação em álcool etílico em concentrações crescentes.

Os fragmentos foram lavados em óxido de propileno, durante 10 minutos, após isso iniciou a infiltração em araldite SO₂ - Polysciences. Os fragmentos foram imersos em uma mistura de óxido de propileno e araldite na proporção de 1:2 durante uma hora, 1:1 durante 12 horas, araldite pura durante 4 horas e finalmente em araldite pura mais ativador, para assim então, confeccionar os blocos, sendo levados à estufa a 60 °C por três dias.

Obtidos os blocos, foram confeccionados cortes semifinos com 0,4 µm de espessura em ultramicrotomo automático (Ultracut R, Leica Microsystems - Germany), corando-se a quente em solução aquosa de azul de Toluidina a 1% para a identificação de suas regiões, foi analisado em microscópio de luz, para então obtenção dos cortes ultrafinos. Os cortes com 0,07 µm de espessura foram coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila saturado a 2%, durante 7 a 10 minutos, e logo após em citrato de chumbo a 0,5%, durante o mesmo período utilizado para o acetato de uranila. O material foi analisado em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni268D, FEI Company, The Netherlands; MegaView III câmera, Soft Imaging, Germany) e diferentes regiões dos rins foram caracterizadas e eletromicrografadas.

4.2.5- IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram realizadas reações de imunohistoquímica em mesonefro e metanefro de embriões e fetos de gatos para os seguintes marcadores: PCNA (sc-56 1:100, proliferating cell nuclear antigen, clone PC10, St. Louis, U.S.A); CD90 (Serotec 0895

1:100, monoclonal for feline, UK); Caspase 3 (sc-271759 1:100, mouse monoclonal, Santa Cruz, antibody Inc., Europe); Isolectina, (I21411 1:100, Isolectin IB4 Biotin Conjugates Antibody), segundo protocolo rotineiramente utilizado em nosso laboratório (OLIVEIRA et al. 2012). O controle negativo das reações imunohistoquímicas foi realizado utilizando o IgG (Goat anti-Mouse IgG – AP 308F, Chemical International).

4.3. RESULTADOS

4.3.1 CARACTERÍSTICAS EXTERNAS GERAIS DOS EMBRIÕES E FETOS

Os resultados obtidos através da análise das características externas dos embriões e fetos foram expressos, em ordem cronológica de dias gestacionais, na tabela abaixo.

Tabela1: Características externas gerais dos embriões e fetos.

Dias Gestacionais	Peso (g)	Crown-rump (cm)	Características externas
15	0,11	0,5	Início da formação dos somitos, protuberância cardíaca, quatro arcos branquiais, estomodeu, ausência de vesícula óptica e ótica.
17	0,11	0,8	Torção da extremidade caudal, vesícula óptica com início de pigmentação, broto dos membros torácicos e pélvicos e regiões encefálicas em formação.
19	0,16	1,1	Cabeça toca a eminencia cardíaca, presença da vesícula ótica, placóide olfatório e formação do broto do membro torácico, em formato de pá e membro pélvico presente.
20	0,32	1,1	Vesícula óptica, estomodeu, inicia-se divisão dos dígitos dos membros torácicos.
21	0,68	2,1	Hérnia fisiológica umbilical, os olhos bem formados e pigmentados e membros torácicos com membranas interdigitais, membros pélvicos sem separação dos dígitos.

22	1,54	2,5	Início da formação de mamas, palma da mão entalhada, separação dos dígitos e indício da presença de costelas.
24	3,34	3,1	Apresentam os dígitos do membro pélvico separado distalmente, folículos táteis presentes nos lábios, primórdio das glândulas mamárias.
26	6,28	3,8	Folículos pilosos e pálpebras se formando, divisão dos dígitos nos membros pélvicos e torácicos, primórdios das garras em membros pélvicos e torácicos.
28	19,38	6,5	Folículos táteis, separação dos dígitos, língua visível, fechamento das pálpebras e formação das garras.
37	32,52	7,5	Pálpebras, palato fundido e pelos táteis.
50	43,28	9,3	Início do desenvolvimento dos pelos.
60	130,76	13	Todas características formadas, pigmentação dos pelos e garras brancas e duras.

4.3.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS URINÁRIOS

Em relação às estruturas urinárias, nos embriões com 19 dias, o mesonefro apresentou dorsalmente os ductos mesonéfricos, caudalmente os túbulos mesonéfricos e ventralmente os glomérulos. Macroscopicamente, foi observado o mesonefro através de dissecção e por microscopia eletrônica de varredura foi possível verificar o pronefro, ilustrando a transição do pronefro para o mesonefro. Os corpúsculos pronéfricos, ductos pronéfricos e túbulos pronéfricos com epitélio cúbico simples presentes no pronefro apresentavam-se mais arredondadas e próximas umas das outras enquanto o mesonefro apresentou o glomérulo com epitélio simples pavimentoso, ductos mesonéfricos e túbulos mesonéfricos com epitélio cúbico simples mais alongados e dispersos. Já o embrião de 22 dias possuía o mesonefro em transição de seu formato alongado para o oval. Cranialmente a ele localizam-se a gônada e ao seu lado o metanefro em estágio inicial. Microscopicamente, observou-se as três estruturas que compõem o mesonefro: glomérulos, túbulos mesonéfricos e ductos mesonéfricos.

Em embriões de 22 dias foi evidenciado o início do desenvolvimento do metanefro. Macroscopicamente, o metanefro apresentou-se menor do que o

mesonefro e, nesta fase, ambos se encontravam unidos anatomicamente. Em corte sagital não foi possível diferenciar nenhuma de suas estruturas. Microscopicamente, o metanefro estava em estágio inicial de formação glomerular, onde o parênquima começava a dar indícios de sua diferenciação.

Para analisar macroscopicamente as demais estruturas do início do sistema urinário, utilizou-se para a metade da gestação o embrião de 24 dias, nesta fase, encontrou-se ureter, uretra e bexiga, mas ainda em desenvolvimento (Figura 1)

Figura 1 - Macroscopia e microscopia de órgãos urinários de embriões de gato em início de gestação

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Macroscopia e microscopia de órgãos urinários. Em A, mesonefro de 19 dias de gestação em análise macroscópica (Ms). Em B, microscopia eletrônica de varredura evidenciando o mesonefro com 19 dias gestacionais. Nesta fase pode-se evidenciar o mesonefro (Ms) e o pronefro (Pr), no * pode-se ver o aumento das estruturas do pronefro. Em C, microscopia eletrônica de luz em embriões de 19 dias evidenciando o mesonefro (Ms) e pronefro (Pr). Em D, embrião de 22 dias evidenciando mesonefro (Ms) desenvolvido em formato oval e o metanefro (Mt) no início de seu desenvolvimento, porém já em formato de feijão. Em E, F e G embriões de 22 dias evidenciando o início do desenvolvimento do metanefro (Mt) com presença do mesonefro (Ms) em E e F. Em H e I, microscopia de luz evidenciando as estruturas presentes no metanefro de 22 dias. Em J, análise

macroscópica dos órgãos urinários com 24 dias, metanefro (Mt), mesonefro (Ms), ureter (seta), bexiga (b) e uretra (ur). Em K, 24 dias, ureter evidenciando epitélio de transição (TE) e lâmina própria (LP). Em L, 24 dias, bexiga com epitélio de transição (TE) e lâmina própria (LP). Em M, 24 dias, uretra com camada de epitélio (ep).

Na metade do desenvolvimento embrionário, aos 28 dias, o mesonefro estava bem desenvolvido e em formato oval. Através da microscopia de luz pode-se evidenciar os glomérulos, túbulo mesonéfrico e ducto mesonéfrico nos quais, no glomérulo existia epitélio simples pavimentoso e nas demais estruturas, epitélio cúbico simples. As mesmas estruturas foram evidenciadas por microscopia eletrônica de varredura e foi possível notar que o espaço urinário no glomérulo é menor no mesonefro do que no metanefro.

Diferentemente do início do desenvolvimento, o metanefro de 28 dias encontrou-se maior que o mesonefro e em formato característico do órgão adulto. Nesta fase ainda não foi possível observar diferenciação de córtex e medula e isso foi comprovado tanto macroscopicamente quanto microscopicamente onde existem glomérulos presentes por toda a estrutura. Microscopicamente foram evidenciados os glomérulos, túbulo proximal e túbulo distal, além do corpúsculo renal com espaço urinário evidente.

Analisando as demais estruturas do sistema urinário, observou-se que as estruturas estavam mais desenvolvidas, porém não completamente. Na bexiga pode-se observar o epitélio de transição, uma camada de tecido conjuntivo e apenas uma camada muscular. Observou-se também a uretra com camada de epitélio e tecido conjuntivo e o ureter em formato tubular (Figura 2).

Figura 2 - Macroscopia e microscopia de órgãos urinários de embriões de gato em meio de gestação

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Macroscopia e microscopia de órgãos urinários de embriões de gato em meio de gestação.

Em A, o metanefro (Mt) e mesonefro (Ms) concomitantes sendo que o mesonefro está bem desenvolvido e em formato oval. Em B e C, mesonefro (Ms) com presença de glomérulo (g), ducto mesonéfrico (md) e túbulo mesonéfrico (mt). Em D, glomérulo (g) com espaço urinário diminuído, túbulo mesonéfrico (mt) e ducto mesonéfrico (md). Em E, metanefro (Mt) mostrando que o rim não estava dividido em córtex e medula. Em F e G, embrião com 28 dias gestacionais onde em F o metanefro (Mt) não apresenta divisão em córtex e medula, os glomérulos (g) estão presentes por toda a estrutura e em G, glomérulo (g), túbulo contorcido proximal (pct) e túbulo contorcido distal (dct). Em H, corpúsculo renal (rc) e espaço urinário (seta) visualizado em técnica de microscopia eletrônica de varredura. Em I, todos os órgãos urinários estão presentes: metanefro (Mt), ureter (u), bexiga (bx) e uretra (ur) inclusive ainda se tem a presença do mesonefro (Ms). Em J, ureter evidenciando epitélio de transição (TE) e tecido conjuntivo (CT). Em K, bexiga evidenciando epitélio de transição (TE), tecido conjuntivo (CT) e camada muscular (ML). Em L, uretra evidenciando epitélio de transição (TE) e tecido conjuntivo (CT).

Com relação a análise do terceiro estágio do desenvolvimento. O mesonefro regrediu aos 37 dias gestacionais. Microscopicamente, pode-se observar que as estruturas começaram a se degenerar, mas ainda foi possível evidenciar a presença de glomérulos, túbulos e ductos mesonéfricos (Figura 3).

Aos 50 dias, o metanefro já estava dividido em região cortical e medular, também foi possível observar a pseudopapila, crista renal e a pelve renal. Na análise microscópica, notou-se os corpúsculos renais, túbulos contorcidos proximais e distais. Através da coloração por Ácido periódico de Schiff os túbulos contorcidos proximais foram fortemente corados pois esta coloração marca o glicocálix presente nas microvilosidades que compõem a borda em escova dos túbulos contorcidos proximais. Na sequência notou-se no corpúsculo renal, a arteríola aferente entrando no glomérulo, o polo urinário e túbulo contorcido proximal. O corpúsculo renal era composto pelo glomérulo e pela cápsula de glomerular a qual apresentou dois folhetos, o parietal e o visceral. O glomérulo possuía capilar glomerular revestido por células endoteliais e era preenchido pelo mesângio. Na porção medular, notou-se a região tubular, compostos pelos túbulos coletores, segmentos da alça do néfron espessos e delgados, interstício e ductos coletores (Figura 3).

Analizando as outras estruturas do sistema urinário, aos 50 dias, encontrou-se o metanefro, bexiga, ureteres e uretra presentes e completamente formados. A bexiga encontrou-se com epitélio de transição, abaixo lâmina própria e tecido conjuntivo denso, após essas camadas, submucosa própria e três camadas de músculo liso. Observou-se uretra com epitélio e tecido conjuntivo. No ureter foi possível observar epitélio de transição ou urotélio, lâmina própria colágena, revestido de duas camadas de músculo liso, dispostas como uma espiral interna, chamada de camada longitudinal e uma camada externa chamada camada circular, que, por sua vez, estava circundada por uma camada adventícia colágena frouxa (Figura 3).

Figura 3 - Análise Macro e Microscópica dos órgãos urinários do final do período gestacional

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Análise Macro e Microscópica dos órgãos urinários do final do período gestacional. Em A e B, embrião de 37 dias gestacionais, notar mesonefro em regressão (seta). Em C e D, histologia de mesonefro de embrião de 37 dias de gestação evidenciando glomérulo (g), túbulos (t) e ductos (d) em degeneração. Em E, 50 dias, metanefro dividido em região cortical (C) e medular (M), também é possível observar a pseudopapila (pp), crista renal (seta preta) e a pelve renal (P). Em F, microscopia eletrônica de varredura do metanefro aos 50 dias, dividido em região cortical (C) com a presença de glomérulos (g) e medular (M) com a presença de túbulos (t). Em G, rim aos 50 dias dividido em córtex (C) e medula (M). Em H, metanefro de feto com 50 dias ilustrando a diferença entre os túbulos proximais (pct) com coloração mais acentuada nas bordas em escova (seta) e túbulos contorcidos distais (dct). Em I, corpúsculo renal composto pelo glomérulo (g) e pela cápsula glomerular a qual apresenta dois folhetos, o parietal (seta branca) e o visceral (seta preta). Em J, glomérulo com capilar glomerular (seta preta) revestido por células endoteliais (seta branca) e é preenchido pelo mesângio (*). Em K, corpúsculo renal (rc) visualizado em técnica de microscopia eletrônica de varredura. Em L, região medular (mr), região tubular, compostos pelos túbulos coletores (ct), segmentos da alça do nefron espessos (thick) e

delgados (thin), interstício (*) e ductos coletores (cd). Em M, encontra-se o metanefro (Mt), bexiga (b), ureteres (u) e uretra (ur) presentes e completamente formados. Em N, ureter com epitélio de transição (TE) e lâmina própria colágena (ocb), revestido de duas camadas de musculo liso, dispostas como uma espiral interna, chamada de camada longitudinal (ll) e uma camada externa chamada camada circular (CL), que, por sua vez, está circundada por uma adventícia colágena frouxa (alc). Em O aos 60 dias, a bexiga encontra-se com epitélio de transição (TE), lâmina própria (LP) e tecido conjuntivo denso (dct), submucosa própria (sp) e três camadas, a primeira (*), a segunda (*) e a terceira (*). Em P, uretra com epitélio (ep) e tecido conjuntivo (CT).

Outros dados foram obtidos pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão, na qual foi possível evidenciar os tipos de células e organelas presentes no néfron. No mesonefro de início e meio de gestação foi possível evidenciar nos glomérulos os podócitos, células mesangiais e capilares glomerulares, já no mesonefro de final de gestação observou-se que as células estavam se degenerando, não observando as delimitações celulares. Na sequência tem-se o metanefro de início para metade e final de gestação, no qual foi possível observar glomérulos com podócitos, células mesangiais e capilares sanguíneas. As células possuíam núcleo e nucléolo, na região citoplasmática evidenciou-se as mitocôndrias. Também foi observado região tubular, onde distinguiu-se os túbulos contorcidos distais e proximais. O túbulo contorcido proximal apresenta no seu epitélio borda em escova diferente do túbulo distal que não possui. (Figura 4).

4.3.3 ANÁLISE ULTRAMICROSCÓPICA DE MESONEFRO E METANEFRO DE GATO DOMÉSTICO

Figura 4- Avaliação mediante Microscopia Eletrônica de Transmissão do início e final do mesonefro

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Avaliação mediante Microscopia Eletrônica de Transmissão do início e final do mesonefro.

Em A, B e C, mesonefro de início do desenvolvimento, onde é possível observar em A, podócitos (P) e os capilares sanguíneos (c). Em B, imagem ampliada do podócitos evidenciando mitocôndrias (m), citoesqueleto (Cs) e núcleo (N). Em C, célula mesangiais (mc). Em D, observa-se mesonefro no final de desenvolvimento, no qual é possível observar a sua degenerando, observado através da presença de vacúolos (*) e lisossomos (seta). Em E, metanefro de início evidenciando glomérulos (g), capilares sanguíneos (c) e as células mesangiais (mc). Em F capilares sanguíneos (c) e células sanguíneas (RBC) e células mesangiais (mc). Em G, túbulo contorcido proximal (pct) evidenciando borda em escova (seta). Em H, túbulo contorcido distal (dct). Em I, glomérulo do final do metanefro, no qual é possível observar os capilares sanguíneos (c), podócitos subdivididos em corpo celular (*) e prolongamento dos pés (seta) e célula sanguínea (RBC).

4.3.4 IMUNOHISTOQUÍMICA DE MESONEFRO E METANEFRO DE GATO DOMÉSTICO

Nas análises de imunohistoquímica das amostras de mesonefro e metanefro 22, 28, 37 e 50 dias, foi possível observar imunomarcção positiva para isolectina, marcador de neovasculogenese presentes nos túbulos e glomérulos. Também foi possível observar em mesonefro e metanefro de embriões e fetos de 28 e 50 dias gestacionais a expressão de marcadores para células embrionárias (CD9) e proliferação celular (PCNA), durante o desenvolvimento renal. Com isso, para o marcador CD9, apenas houve expressão no mesonefro, o qual foi um estágio mais primitivo do que o metanefro. Já para o PCNA tanto o mesonefro quanto o metanefro houve expressão, mostrando que ambas as fases possuíram proliferação celular. Mediante a utilização do marcador Caspase3 foi possível observar a degeneração celular do mesonefro aos 37 dias, sendo a única idade que houve expressão positiva (Figura 5).

Figura 5 - Imunohistoquímica em embriões e fetos de gatos domésticos.

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Imunohistoquímica em embriões e fetos de gatos. Em A, B, C, D, E, F e G, marcação positiva para Isolectina, marcador de neovasculogênese em túbulos e glomérulos (seta) em mesonefro de 22, 28 e 37 dias e metanefro 22, 28 e 50 dias respectivamente. Em H, I e J, marcação positiva para CD9 (seta) em mesonefro de 28 e 37 dias respectivamente. Em K e L, não houve marcação para CD9 para metanefro nos dias 28 e 50 respectivamente. Em M, N, O e P, marcação positiva para PCNA, marcador de células proliferativas (seta) em mesonefro 28 e 37 dias e metanefro 28 e 50 dias respectivamente. Em Q, R, S e T, reação para Caspase 3, em mesonefro de 28 e 37 dias e em metanefro de 28 e 50 dias respectivamente, a qual só houve marcação positiva para mesonefro de 37 dias.

4.4. DISCUSSÃO

Para realização deste estudo, os órgãos dos embriões/fetos foram divididos em três períodos gestacionais, levando em consideração o período gestacional de 63 dias descrito por Evans e Sack (1973). Essa divisão didática faz com que cada órgão seja analisado em períodos para melhor avaliação.

Na primeira fase, os embriões de 19 e 20 dias encontram-se muito semelhantes e, para classifica-los, foi utilizado como critério o desenvolvimento do membro torácico, visto que, em 19 dias, encontrou-se em formato de pá e em 20 dias encontrou-se com membranas que aparecem no início da divisão dos dígitos (EVANS E SACK 1973).

Microscopicamente no início do desenvolvimento embrionário de gatos domésticos observou-se a presença do rim primitivo ou pronefro. Nos mamíferos, o pronefro é afuncional e permanece por pouco tempo antes de regredir (KNOSPE, 2002). O pronefro é uma característica evolutiva herdada dos peixes, onde este é de grande importância por ser funcional e, portanto, o rim definitivo na espécie. O pronefro dos peixes tem estruturas semelhantes às de um nefro de um mamífero, com as principais estruturas sendo os ductos pronéfricos, túbulos pronéfricos e corpúsculos pronéfricos (BRANDLI, 2003). O mesonefro, segunda estrutura renal encontrada, em mamíferos, apresenta uma fase funcional já no período embrionário (HYTTEL et al., 2012). Já para os anfíbios, o mesonefro é funcional no adulto, possuindo características semelhantes às de um nefro de mamíferos (MØBJERG et al., 1997). A importância de estudar essas características no início do desenvolvimento de gatos é que a literatura é escassa e as informações são importantes para conhecimento da própria espécie assim como correlacioná-la com os demais animais.

No grupo seguinte, os achados macroscópicos foram melhor correlacionados com os descritos por Evans e Saks (1973), sendo que embriões de 21 dias apresentavam intestino herniado pelo cordão umbilical, o principal contribuinte para sua hérnia é o tamanho do mesonefro (HYTTEL et al., 2012). Embriões de 22 dias, o início da formação da cadeia mamária, aos 26 dias, embriões com separação dos dígitos dos membros pélvicos e sem externalização da língua, característica de embriões com 27 dias. Um dado importante obtido neste estudo foi o formato oval do mesonefro e formato de feijão do metanefro em início de desenvolvimento.

Relacionando esses achados com os dados obtidos pelo autor Knospe (2002), pode-se perceber uma relação dos dias em que o mesonefro está presente no desenvolvimento embrionário, de 15/17 dias a 34/44 dias, sendo, em média, o auge de seu desenvolvimento de 27 a 30 dias (TIEDEMANN, 2012).

Na sequência, aos 28 dias, tem-se o último estágio embrionário. Nesta fase é possível evidenciar as pálpebras se fechando e as garras se formando (EVANS E SACKS, 1973). Todo o sistema urinário está presente macro e microscopicamente. Nesta fase o rim ainda não está completo, o mesonefro com suas estruturas estão bem evidentes, o que está de acordo com os dados de Tiedemann (2012), nos quais, em fetos de gatos com 28 dias observam-se somente glomérulos completamente formados e funcionais e nenhum imaturo ou em degeneração. O metanefro não se diferenciou em região cortical e medular, estes dados foram confirmados através de microscopia de luz, onde encontram-se glomérulos por toda a estrutura.

Seguindo a cronologia proposta por Evans e Sack (1973), fetos de 37 dias possuíam pêlos táteis na face e macroscopicamente o mesonefro está regredindo enquanto o metanefro está se desenvolvendo, porém não foi possível diferenciar sua região de córtex e medula. Os dados da regressão do mesonefro estão de acordo com o Tiedemann (2012) que foram verificadas mudanças aparentes de regressão no órgão. Importante ressaltar que as estruturas se degeneram e não migram para o metanefro e apenas alguns de seus túbulos irão fazer parte do sistema reprodutor (HYTTEL et al., 2012; TIEDEMANN, 2012). Nesta fase do desenvolvimento gestacional, o gato é considerado feto. Denomina-se feto aquele que possui suas características externas específicas de sua espécie bem como seus órgãos genitais diferenciados (PIERI et al., 2015).

Na última fase do desenvolvimento, 50 e 60 dias gestacionais, o feto já se encontra com todas suas características formadas, apenas finalizando seu crescimento, o sistema urinário contém metanefro dividido em córtex e medula, ureteres, bexiga e uretra totalmente formados, assim como descritos por Dyce (2010) para animais domésticos e Knospe (2002) em gatos, microscopicamente também foram encontradas todas as estruturas formadas e bem definidas como de acordo com Bacha e Bacha (2003) e Junqueira e Carneiro (2008). As estruturas que compõem o néfron estavam totalmente desenvolvidas e funcionais como demonstra Dressler (2006) em mamíferos.

Avaliando a nível celular a partir da microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar os constituintes dos glomérulos e túbulos contorcidos, bem como as principais organelas que estão presentes nestas estruturas. Fazendo uma comparação das estruturas presentes no corpúsculo renal do mesonefro de anfíbios, o qual tem este órgão como rim definitivo com o gato, pode-se observar uma certa relação nos tipos celulares presentes em ambos os mesonefros, como capilares glomerulares, células mesangiais e podócitos. Nos gatos, este órgão é temporário, ele é funcional durante o desenvolvimento embrionário mas degenera no período fetal (KNOSPE, 2002), isto foi observado através de lisossomos e vacúolos que se formaram nas células. Estas organelas são responsáveis pela digestão intracelular (CUNNINGHAM, 2008) característico da degeneração deste órgão.

O rim definitivo em gatos é o metanefro, que também apresenta as mesmas estruturas do corpúsculo renal, descritas no mesonefro. Estas células são de extrema importância pois cada uma desempenha uma função específica no rim. Os capilares glomerulares são responsáveis por capitar o sangue que atinge o glomérulo, no qual será filtrado (CUNNINGHAM, 2008), as células mesangiais são responsáveis pela sustentação do mesmo e os podócitos fazem parte da filtração do sangue. No metanefro também foram observados os túbulos contorcidos proximais e distais, estes diferem um do outro através da borda em escova (SARHAN E HUSSEIN, 2014), presentes apenas nos túbulos proximais. A região tubular é responsável pela confecção da urina onde há reabsorção de água e eletrólitos (CUNNINGHAM, 2008).

Mediante a utilização da técnica de imunohistoquímica, foi possível observar a nível tecidual a formação de vasos presentes nos túbulos e glomérulos. Evidenciando que desde 22 dias o metanefro expressa positivamente a proteína Isolectina, presente na formação glomerular. Houve expressão para marcadores de pluripotência e proliferação celular. O CD9 marcou positivamente o mesonefro em todas suas estruturas, diferente do metanefro que não houve marcação para essa proteína. O CD9 é uma glicoproteína da família tetraspanin, presente na membrana celular envolvida com desenvolvimento, crescimento e motilidade celular (POWNER et al., 2011). A expressão de PCNA é explicada no mesonefro pois mesmo após degeneração, este vai fazer parte do sistema reprodutor, e é possível demonstrar que suas células irão adquirir diferente função em outro órgão que não de origem renal. O mesmo não é observado no metanefro, o qual, do início ao fim, terá células responsáveis pela mesma função em um mesmo órgão. O antígeno nuclear de

proliferação celular (PCNA) estava expresso em todas as estruturas do mesonefro e metanefro. O PCNA codifica uma proteína que é encontrada no núcleo e é um cofator da DNA polimerase delta (BOEHM et al.,2016), tendo como função replicar e reparar o DNA. Todas as células presentes tanto no metanefro quanto no mesonefro irão se proliferar seja para renovação celular ou para diferenciação das mesmas. O marcador Caspase 3 foi utilizado para comprovar que aos 37 dias gestacionais o mesonefro estava em degeneração celular diferentemente das demais idades. Estes dados são de extrema importância para avaliar os estágios renais, visto que no desenvolvimento, a taxa de proliferação e diferenciação celular vai diminuindo gradativamente.

A organogenese urinária em felinos contribui com novos conhecimentos específicos sobre o desenvolvimento embrionário nos órgãos que são os mais afetados por doenças nessa espécie, e também dá suporte para futuros estudos em espécies que essas estruturas embrionárias e fetais ainda não foram descritas. O desenvolvimento embrionário e fetal do gato é semelhante ao dos demais mamíferos, ressaltando que o pronefro é encontrado no embrião de 15 a 19 dias, o mesonefro de 17 a 37 e o metanefro a partir de 21 dias gestacionais.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. M. **Embriologia veterinária comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

ABREU, D. K. et al. Estudo microscópico e macroscópico, com enfoque radiográfico e de alizarina, no desenvolvimento embrionário e fetal de gatos domésticos (*Felis catus*) em diferentes idades gestacionais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. a00101s1, p. 57-66, 2011.

BACHA, W.J., BACHA, L.M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2ª edição. Roca, São Paulo, pp. 276, 2003.

BOEHM, E. M. et al. The PCNA-Interacting Protein (PIP) Motif of DNA Polymerase η Mediates its Interaction with the C-Terminal Domain of Rev1. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M115. 697938, 2016.

BRANDLI, A. W. Towards a molecular anatomy of the *Xenopus* pronephric kidney. **International Journal of Developmental Biology**, v. 43, n. 5, p. 381-395, 2003.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. **Urologia e Nefrologia do Cão e do Gato**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2011.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008, p. 531-539.

DE COMUNICAÇÃO, A. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. **AgroANALYSIS**, v. 35, n. 1, p. 35-40, 2015.

DRESSLER, G. R. The cellular basis of kidney development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 509-529, 2006.

DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010. 856 p.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 2, n. 1, p. 11-45, 1973.

GARCIA, S. M. L; FERNÁNDEZ, C. G. **Embriologia**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

HYTTEL, P.; SINOWATZ F.; VEJLSTED M. **Embriologia veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2012, p. 252-285.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 556 p.

KING, J. N. et al. Prognostic factors in cats with chronic kidney disease. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 21, n. 5, p. 906-916, 2007.

KNOSPE, C. Periods and stages of the prenatal development of the domestic cat. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2002.

LEFEBVRE, S. Literature Review–Epidemiology of Feline Chronic Kidney Disease. **Banfield Journal**, 2011.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 251-264.

MØBJERG, N.; LARSEN, E. H.; JESPERSEN, Å. Morphology of the nephron in the mesonephros of *Bufo bufo* (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Acta Zoologica**, v. 79, n. 1, p. 31-50, 1998.

PIERI, N. C. G. et al. Comparative development of embryonic age by organogenesis in domestic dogs and cats. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, n. 4, p. 625-631, 2015.

POLZIN, D. J. 11 Guidelines for conservatively treating chronic kidney disease. **Veterinary Medicine**, p.788- 799. 2007.

POWNER, D.; KOOP, P. M.; MONKLEY, S. J.; CRITCHLEY, D. R.; BERDITCHEVSKI, F. Tetraspanin CD9 in cell migration. **Biochemical Society Transactions**, v. 2, p. 563-567, 2011.

SAINIO, K.; RAATIKAINEN-AHOKAS, A. N. N. E. Mesonephric kidney--a stem cell factory?. **International Journal of Developmental Biology**, v. 43, n. 5, p. 435-439, 2003.

SARHAN, O. M. M.; HUSSEIN, R. M. Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 1505, 2014.

TIEDEMANN, K. **The mesonephros of cat and sheep: Comparative morphological and histochemical studies**. Springer Science & Business Media, 2012. 122p.

TOLOSA E.M.C.; RODRIGUES C.J.; BEHMER O.A.; NETO, A.G. F. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2ª ed., São Paulo: Manole, 2003. p.331.

5. Comparação das linhagens celulares encontrados no mesonefro e metanefro de gatos (*Felis catus*, Linnaeus, 1798)

Lara Carolina Mario¹, Jéssica Borghesi¹, Adriana Raquel de Almeida da Anunciação¹, Ana Claudia de Oliveira Carreira^{1,2}, Phelipe de Oliveira Favaron¹, Mariano del Sol^{3,4}, Samirah Abreu Gomes^{1,5}, Maria Angelica Miglino¹.

¹ Setor de Anatomia dos animais domésticos e silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo FMVZ/USP.

² Nucel- Núcleo de Pesquisas em terapias celulares.

³ Doctoral Program in Morphological Sciences, Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

⁴ Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

⁵ Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo FM/USP.

RESUMO: A doença renal crônica (DRC) é amplamente encontrada em felinos. É caracterizada pela deficiência estrutural e funcional dos rins, perda gradual e definitiva do número de néfrons funcionais e redução na taxa glomerular. Devido à grande importância desta doença, várias terapias celulares vêm sendo estudadas há décadas, com o intuito de obter um tratamento eficaz e definitivo para a mesma. Neste estudo, células provenientes do mesonefro e metanefro de embriões e fetos de gato doméstico foram coletados de campanha na castração eletiva na cidade de Embu das Artes, São Paulo. As células foram cultivadas e caracterizadas quanto a sua morfologia, viabilidade e metabolismo celular, potencial tumorigênico, imunofenotipagem por citometria de fluxo, diferenciação para células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas. Como resultado observamos que os quatro tipos celulares apresentam características morfológicas de células epiteliais, com citoplasma arredondado, e de células mesenquimais, com citoplasma alongado. Os quatro tipos celulares apresentam aderência, capacidade de formação de colônias e ausência de potencial tumorigênico. O melhor meio para cultivo foi o Alpha Mem. Dentre as proteínas testadas, essas linhagens celulares expressaram marcação positiva para células progenitoras renais, tais como CD117, Nefrina e WT1, e apresentaram potencial para diferenciação em células adipogênicas, osteogênicas,

condrogênicas. Portanto podemos concluir que todos os quatro tipos celulares apresentam características promissoras para novas terapias celulares, porém dentre estes tipos celulares, o mais indicado seria a linhagem de células provenientes de metanefro de final do período gestacional, visto que essa linhagem apresenta maiores expressões de proteínas específicas de tecido renal, além de possuir células que serão propriamente funcionais no indivíduo adulto, sendo assim esta linhagem celular apresenta vantagens quando comparada as demais para uma nova terapia celular.

Palavras-chave: Cultivo celular; Doença Renal; Embriologia; Rim

5.1 INTRODUÇÃO

Os gatos domésticos são amplamente afetados por doenças renais, sendo a segunda maior causa de óbito nestes animais (CHEW et al., 2011). As doenças renais diminuem a função renal, causando injúrias que prejudicam o processo de filtração e remoção de resíduos presentes na corrente sanguínea (BANFILD, 2017). Segundo dados apresentados pela rede hospitalar Banfield (2017), as doenças crônicas renais aumentaram 29% desde 2010. Em 2014, 1 em cada 10 gatos geriátricos apresentava esta injúria renal (BANFILD, 2017).

Entre os principais tipos de DRC podemos citar as glomerulopatias (VADEN, 2011), e as nefrites intersticiais tubulares (WOO et al., 2012; SCHMIEDT et al., 2016). Há muito tempo se estuda estas doenças em felinos. Em 1994, Minkus e Horauf, realizaram um estudo no qual 47 amostras de rins de gatos foram obtidas por biópsia e assim verificou-se a presença de azotemia primária renal. Destes valores, 70,4% dos casos apresentavam nefrite tubulointersticial crônica, 14,8% glomerulopatia. Existem também as doenças paralelas ao desenvolvimento de doenças renais, chamadas de doenças secundárias e podem levar o animal ao quadro de DRC (VADEN, 2011).

Os tratamentos atuais para DRC são apenas paliativos, consistindo em dietas alimentares e reposição de eletrólitos. Os tratamentos auxiliam na diminuição da velocidade e progressão da doença, visando assim uma melhor qualidade de vida para os animais (WAKI et al., 2010). O uso de transplantes renais e hemodiálise geralmente não são técnicas utilizadas como tratamentos, tendo em vista a grande dificuldade tanto financeira quanto técnicas (BARBER, 2003).

Sabendo da dificuldade terapêutica para a DRC, novas terapias estão sendo pesquisadas. O uso de células-tronco como uma nova fonte para terapias vem crescendo cada vez mais (QUIMBY et al., 2013; CARDOSO et al., 2014; VIDANE et al 2016). As células-tronco apresentam vários papéis importantes na vida de um indivíduo, tais como divisão e renovação celular, entretanto atualmente elas estão sendo muito utilizadas em terapias para diversas doenças das quais não se tem tratamentos eficazes, pois elas liberam fatores de crescimento que auxiliam nos processos inflamatórios, auxiliando-as no ambiente as quais elas são inseridas e fornecendo um efeito parácrino para as células (TOGEL et al., 2005).

Diversas pesquisas estão utilizando fontes variáveis de células-tronco para realizar tratamentos em gatos com DRC. Quimby et al. (2011; 2013), utilizou células mesenquimais oriundas do tecido adiposo e da medula óssea de gatos domésticos, enquanto Cardoso et al. (2014) e Vidane et al. (2016) isolaram células do âmnio para tratamentos de gatos com DRC. Porém até o presente momento não foram encontrados resultados dos quais revertissem este quadro clínico completamente, apenas conseguiram melhorias na qualidade de vida desses animais, o que nos instiga a buscar novas fontes alternativas de terapias para esta enfermidade.

Atualmente muitos estudos estão sendo realizados no campo das células progenitoras do tecido ou órgão ao qual apresenta-se lesionado. Por essas células já serem pré-direcionadas a formar as estruturas do órgão em questão, acredita-se que elas possam apresentar um melhor potencial terapêutico em relação as demais (RAFI E LYDEN, 2003). Portanto, sabendo dos problemas causados pela DRC em felinos e dos novos potenciais trazidos pelas terapias celulares, este trabalho busca estudar a ação das células progenitoras renais como um novo modelo em terapias celulares, as quais visem melhorias significativas nestas enfermidades para esta espécie.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 COLETA DO MATERIAL

Para a coleta dos mesonefro e metanefro de embriões e fetos de gato doméstico, foram utilizadas 12 gatas prenhas provenientes de campanhas de castração eletiva da cidade de Embu das Artes, São Paulo. O projeto encontra-se

aprovado pela comissão de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob número do protocolo: CEUA nº 9798110215.

5.2.2 DIVISÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Para obtenção das células progenitoras renais, embriões e fetos foram dissecados e os mesonefros e metanefros retirados e processados. Neste estudo, utilizamos quatro idades diferentes, assim como descrito na Tabela1.

Tabela1: Separação das amostras em 4 diferentes linhagens celulares

MESONEFRO		METANEFRO	
INÍCIO DO PERÍODO GESTACIONAL	Metade do período gestacional	Metade do período gestacional	Final do período gestacional
19 A 21 DIAS	26 a 30 dias	26 a 28 dias	50 a 60 dias

Fonte: MARIO, L C. (2019)

5.2.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS MESONEFROS E METANEFROS DE EMBRIÕES E FETOS DE GATO

As idades dos embriões e fetos foram estimadas segundo o método de Crown-Rump e por meio de suas características externas assim como descritos por Evans e Sack (1973), confrontando também literaturas mais recentes como Knospe (2002), Abreu et al. 2011 e Pieri et al. 2015.

5.2.4 MICROSCOPIA DE LUZ DOS MESONEFROS E METANEFROS DE EMBRIÕES E FETOS DE GATO

Para análise das características histológicas dos órgãos, embriões e fetos foram fixados em solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5%. Após a fixação o material foi desidratado em uma série crescente de etanol (70% a 100%), seguido de diafanização em xilol, e embebidos em parafina (Histosec) (TOLOSA et al., 2003).

Os blocos foram cortados em micrótomo automático (Leica, RM2165, Germany) obtendo-se cortes de 5 µm, os quais foram aderidos em lâminas histológica.

Após serem desparafinizados, os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina e em Ácido periódico de Shiff. Em seguida, as lâminas foram analisadas e as características morfológicas fotodocumentadas através de microscópio Nikon Eclipse 80i.

5.2.5 ISOLAMENTO, OBTENÇÃO E CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS DERIVADAS DO MESONEFRO E METANEFRO.

As amostras foram dissecadas para retirada do mesonefro e metanefro, os quais foram depositados em placas de Petri e lavados cinco vezes com PBS (Phosphate Buffered Saline), acrescido de amicacina 0,5%, para remoção de possíveis elementos contaminantes. Após o processo de descontaminação, foi realizada a dissociação mecânica. Os explantes do tecido foram implantados em placas de cultivo de 100 mm de diâmetro (Corning, Cat.3296, NY, USA) e preenchidas com 7 mL de meio de cultivo. Foram testados três meios de cultivo: DMEM-HIGH GLUCOSE (LGC Biotecnologia, Cat. BR30003-05, Cotia, São Paulo), DMEM/HAM'S-F12 (1:1) (LGC Biotecnologia, Cat. BR30004-05, Cotia, São Paulo) e ALPHA MEM (LGC Biotecnologia, Cat. BR30007-05, Cotia, São Paulo) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino, LGC Biotecnologia, Cat. BR330110-01, Cotia, São Paulo), 0,5% de amicacina, 1% de aminoácidos não essenciais (LGC Biotecnologia, Cat. BR30238-01, Cotia, São Paulo). As placas foram mantidas em estufa a 37°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

Após 24 horas de cultivo, foram observadas as primeiras células aderentes. O meio foi trocado 48 horas após a adesão das células. Quando atingiram confluência de 80% foram tripsinizadas para sua expansão. As células foram lavadas com PBS e acrescentado tripsina 0,25% (LGC Biotecnologia, Cat. BR30042-01, Cotia, São Paulo) e mantidas por cinco minutos na estufa a 37°C. Ao final, para neutralizar a tripsina colocou-se a mesma quantidade de meio de cultura e, em seguida, foram centrifugadas por cinco minutos a 1200 RPM, para então serem expandidas nas placas de cultura. Todos os experimentos foram realizados na passagem 4.

5.2.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DO MESONEFRO E METANEFRO.

Para a análise morfológica, as amostras foram avaliadas a cada 3 dias através de um microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100). As células foram avaliadas periodicamente para observar e descrever as variações morfológicas durante seu crescimento. Essas células também foram analisadas quanto aos aspectos morfológicos pela técnica de microscopia eletrônica de varredura. Para esta técnica, as amostras foram colocadas em cultivo sobre lamínulas de vidro. Após a aderência nas lamínulas, as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, lavadas em tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4, e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, seguido de desidratações contínuas em álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e 100%). Por fim, as mesmas foram desidratadas à seco em ponto crítico (Balzers CPD 020). Posteriormente, as amostras foram colocadas em suporte metálico para revestimento em ouro ("sputtering" Emitech K550). Para observar os resultados foi utilizado o microscópio eletrônico ME Leo 435 VP.

5.2.7 TESTE DE VIABILIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR

As células foram tripsinizadas, coradas com azul de tripan e contadas assim como descrito anteriormente. Após serem contadas, as mesmas foram ressuspensas em 1,0 mL de solução de congelamento contendo 90% de SFB e 10% de DMSO (LGC Biotecnologia, Cat.13-0091.01, Cotia, São Paulo) igualmente distribuídas em criotubos (Corning, Cat.430055, NY,USA). Seguido este procedimento, os criotubos foram transferidos para o aparelho Mister Froozen e mantidas em freezer -80°C overnight. Depois de 24 horas, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados.

Após uma semana, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Foram coradas novamente com azul de tripan para a realização da contagem do número de células as quais permaneceram viáveis após esse procedimento de congelamento, realizando assim a contagem do número de células que se encontravam viáveis.

5.2.8 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO-MTT

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, descrito por Carmicheal et al. (1987), consiste na redução do MTT (3-[(4,5- dimethylthiazol-2-yl)- 2,5- diphenyl tetra zolium bromide]), composto de coloração amarela, pela enzima desidrogenase mitocondrial (componente do complexo II do ciclo de Krebs), presente somente em células viáveis. O experimento foi realizado a cada 24 horas durante 3 dias para análise da proliferação celular das células de rins de gato doméstico. Para tanto, 1×10^3 células foram plaqueadas em placas de 96 poços em um volume de 200 μ L/poço para cada dia de experimento. Para realização da análise, o meio de cultura foi removido, e em seguida adicionado 10 μ L da solução de MTT. Essa mistura foi incubada por 2 horas a 37°C protegida da luz. Após esse período, acrescentou-se mais 100 μ L de DMSO nos poços e deixou-se agindo por uma hora no escuro a temperatura ambiente. Por fim foi realizada leitura no espectofotometro a 490nm.

5.2.9 CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para análise imunofenotípica foi utilizado o método de citometria de fluxo. As células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBSA na concentração de 1×10^5 células/mL e incubadas com anticorpos primários (diluição de 1:100) por 30 minutos a 4°C. Após este período as células foram incubadas com o anticorpo secundário (diluição 1:500) por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas e analisadas por citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, USA). O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando células não marcadas e células marcadas apenas com o anticorpo secundário inespecífico. Para cada amostra, foram contados 10000 eventos. Os anticorpos utilizados para detecção das células progenitoras renais foram: CD 34 (ab8158), CD 105 (ab53321), CD 117 (A4502), PCNA (Sc-46), CD90 (DH2A), MHC I (H58A), MHC II (H421A), Wt-1 (ab89901) e Nephrin (ab216692).

5.2.10 ANÁLISE DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO DAS CÉLULAS DERIVADAS DAS ESTRUTURAS RENAI PRIMORDIAIS

Para análise do potencial tumorigênico foram aplicadas 1×10^6 células em 4 camundongos BALB/c Nude. Os animais foram adquiridos e mantidos no biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Inicialmente, as células foram tripsinizadas seguindo protocolo de repique celular, centrifugadas por 5 minutos a 1200rpm e lavadas com PBS. Posteriormente, o precipitado foi ressuspenso em 50 μ L de solução fisiológica e aplicado nos animais. Cada animal recebeu aplicação de 10^6 células por via subcutânea na região dorsal com o auxílio de uma seringa de insulina. A avaliação da ocorrência de formação tumoral foi realizada semanalmente durante o período de oito semanas. Após as oito semanas os animais foram eutanasiados seguindo o protocolo do comitê de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Amostras do fígado, pulmão, rim, coração e baço foram coletados para exames histopatológicos, seguindo as técnicas rotineiras de histologia (TOLOSA, 2003).

5.2.11 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO MESONEFRO E METANEFRO EM CÉLULAS ADIPOGÊNICAS, OSTEOGÊNICAS E CONDROGÊNICAS.

Para a diferenciação das células do presente estudo em células adipogênicas e osteogênicas foram plaqueadas 1×10^4 células para teste e 1×10^3 células para controle sendo cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas para a realização de estudos morfológicos. Quando as células atingiram a confluência de 80%, iniciou-se o processo de diferenciação celular. Primeiramente o meio de cultivo foi removido e foi adicionado 1 mL de meio de indução (adipócitos ou osteócitos) para os testes, e para os controles adicionou-se somente ALPHA MEM, 7,5% SFB e 1% de penicilina/estreptomicina. As placas foram incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ e metade do meio foi trocado 2 vezes por semana. As amostras foram cultivadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ por aproximadamente 14 dias até a diferenciação celular e monitoradas em microscópio de luz invertido (Nikon Eclipse TS-100).

A diferenciação adipogênica foi induzida adicionando (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células diferenciadas em adipócitos e os seus controles foram fixados em solução de paraformaldeído a 4%, por 15 minutos, à temperatura ambiente, e após, lavados em água destilada e incubados em álcool 70% por 2 a 3 minutos e coradas com a coloração Oil Red.

O meio utilizado para a indução da diferenciação osteogênica foi (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As células diferenciadas em osteócitos e os seus controles foram fixados em paraformaldeído a 4% por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram coradas com a coloração de Von Kossa e Alizarina Red e na sequência montadas com resina Permout.

Para a diferenciação condrogênica, 2×10^6 células derivadas dos quatro grupos celulares foram centrifugadas num tubo cilíndrico de 15mL. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi posto em cultivo com meio de diferenciação condrogênica (A10069-01) em estufa de 37 °C e 5% de CO₂ por 14 dias. O meio indutor assim como o meio controle foram trocados 2 vezes por semana. Após 14 dias, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 1 hora, desidratadas em uma série crescente de álcool (50 a 100%) por 10 minutos em cada álcool e diafanizados em xilol I e II por 10 minutos cada. Por fim o tecido foi emblocado em parafina paraplast, cortados em micrótomo automático (Leica, RM2165, Germany) obtendo-se cortes de 5 µm, os quais foram aderidos em lâminas histológica para na sequência serem corados por HE (Hematoxilina e Eosina) (Tolosa, 2003), e posteriormente fotodocumentados em microscópio Nikon Eclipse 80 para observação da formação dos conócitos.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 ANÁLISE MACRO E MICROSCÓPICA DO MESONEFRO E METANEFRO DE EMBRIÕES E FETOS DE GATOS DOMÉSTICOS.

Entre 19 e 21 dias gestacionais o mesonefro de gato doméstico se apresentava alongado (Figura 2A), sendo possível distinguir as estruturas glomerulares, ductos e túbulos mesonéfricos (Figura 2C). Dos 26 aos 30 dias gestacionais, foi observado que o formato do mesonefro variou, tornando-se mais ovalado (Figura 2B). Quanto as suas estruturas histológicas foram notadas as mesmas estruturas citadas anteriormente,

sendo elas composta por uma região de glomérulos e uma região de ductos e túbulos (Figura 2B).

No metanefro, em fases iniciais da gestação (26 a 28 dias), o tecido renal não apresentava divisões relativas às regiões cortical e medular (Figura 2E). Assim, uma análise histológica demonstrou glomérulos entremeados aos túbulos, por toda a extensão do tecido (Figura 2G). O estudo do metanefro, ao final da gestação (entre 50 e 60 dias) mostrou-se totalmente formado, com região cortical e medular nitidamente delimitadas e estruturas definitivas (Figura 2F). Desta forma, na região cortical do metanefro foram observados glomérulos e túbulos contorcidos, proximais e distais, e na região medular os túbulos coletores (Figura 2H).

Figura 1 - Análise macroscópica do metanefro e mesonefro de gato doméstico

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Análise macroscópica do metanefro e mesonefro de gato doméstico. Em A, metanefro aos 19 dias gestacionais no qual é possível observar formato alongado. Em B, mesonefro, 28 dias gestacionais, apresentando formato mais ovalado. Em C, análise histológica do mesonefro aos 19 dias. Observa-se os glomérulos (G), ductos mesonéfricos (seta) e os túbulos mesonéfricos (*). Em D, análise histológica do mesonefro aos 28 dias. Observa-se os glomérulos (G), ductos mesonéfricos (seta) e os túbulos mesonéfricos (*). Em E, metanefro, 28 dias gestacionais, sem divisão corticomedular. Em F, metanefro, 50 dias gestacionais, demonstrando as todas divisões macroscópicas, como região cortical (C) e medular (M), crista renal (seta), pelve renal (*). Em G, análise histológica de metanefro aos 28 dias de gestação, evidenciando glomérulos (G) e região tubular (*), dispersas pelo tecido. Em H, metanefro de 50 dias gestacionais, evidenciando região cortical (C), com glomérulos

(G), túbulos contorcidos proximais (seta) e distais (*), e uma região medular (M), onde evidencia-se a região tubular.

5.3.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR, DE CÉLULAS DERIVADAS DO MESONEFRO E METANEFRO DE GATO DOMÉSTICO

As células derivadas do mesonefro de 20 e 28 dias e do metanefro de 26 e 50 dias gestacionais, foram isoladas pelo método de explante celular, fragmentando o tecido para posterior cultivo em placas de 100 mm, em meio ALPHA MEM suplementado com SFB, aminoácidos e antibiótico. Ao término das primeiras 24 horas de cultivo já era observada liberação das primeiras células. Em mais 72 horas, o cultivo já atingira 80% de confluência celular. As células derivadas de ambos os tecidos, foram então desagregadas da placa de cultivo mediante utilização de 1mL de tripsina e novamente postas em cultivo com o meio ALPHA MEM para expansão das mesmas, até a quarta passagem, limite previamente estabelecido para realização dos experimentos para a caracterização celular.

As células derivadas do mesonefro e metanefro, tanto do início quanto do final da gestação, apresentaram uma cultura mista, contendo células em formato fusiforme, com núcleos centralizados e citoplasma alongado e células cuboides com núcleos centralizados (Figura 2 A- D), ambas aderentes ao plástico da placa de cultivo com formação de colônias planas. As células derivadas de mesonefro e metanefro de início e final de gestação foram criopreservadas em solução de congelamento contendo 90% SFB e 10% de DMSO pelo período de 1 semana. Depois deste período, as células foram descongeladas, em meio ALPHA MEM suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos e antibiótico, e foram cultivadas em placas de 100mm em estufa a 37 C°. Após 24 horas as células encontravam-se aderentes a placa com o formato fibroblastóide e 50% de confluência celular. O repique celular foi realizado após 48 horas do descongelamento. Portanto estas células mantiveram suas características morfológicas e seus padrões de crescimento celular inalterado após a criopreservação (Figura 2 E- H).

Figura 2 - Morfologia celular de células derivadas de mesonefro (20 e 26 dias) e metanefro (26 e 50 dias) de embriões e fetos de gato doméstico.

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Morfologia celular em mesonefro (20 e 28 dias) e metanefro (26 e 50 dias) de gato. Em A e B, células de 20 e 26 dias gestacionais respectivamente onde se observa o formato fusiforme (cabeça de seta) e cuboide (*) das células, de mesonefro com núcleo (N) centralizado e citoplasma (Ci) ao redor. Em C e D, células derivadas de metanefro de 26 e 50 dias gestacionais respectivamente, observar o formato fusiforme (cabeça de seta) e cuboide (*) das células, com núcleo (N) centralizado e citoplasma (Ci) ao redor. Em E e F, células derivadas de mesonefro de 20 e 28 dias respectivamente, e G e H, células derivadas de metanefro aos 26 e 50 dias gestacionais onde vemos que ambas as células apresentam capacidade de formação de colônias e aderência ao plástico.

5.3.3 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Através do ensaio de viabilidade celular, pelo método de azul de trypan, foi possível observar que após o descongelamento as células permaneciam viáveis e com as mesmas características celulares que elas apresentavam antes desse procedimento. A linhagem celular derivada mesonefro de início de gestação teve uma viabilidade de 93% e a de meio de gestação de 92%. Já a linhagem derivada de metanefro de meio de gestação, apresentou 85% das células viáveis após o descongelamento. E a linhagem de final de gestação, apresentou 92% das células viáveis (tabela2).

Tabela 2: Análise da viabilidade celular das linhagens celulares de embriões e fetos de gato.

LINHAGENS CELULARES	MEDIA DE VIABILIDADE CELULAR
MESONEFRO 20 DIAS	93,33%
MESONEFRO 26 DIAS	91,66%
METANEFRO 26 DIAS	84,66%
METANEFRO 50 DIAS	91,66%

Fonte: MARIO, L. C. (2019)

5.3.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA DOS DIFERENTES MEIOS MEDIANTE MÉTODO COLORIMÉTRICO-MTT

As células derivadas do mesonefro de início (20 dias) e de meio (28 dias) e do metanefro de início (26 dias) e final (50 dias) do período gestacional foram cultivadas em três meios diferentes, DMEM HIGH GLUCOSE, DMEM HANS F12 e ALPHA MEM, com objetivo de averiguar a atividade metabólica das células frente a ação de cada meio de cultivo sobre o crescimento celular.

As células derivadas do mesonefro e 20 dias gestacionais cultivadas em meio DMEM HIGH GLUCOSE, apresentaram um discreto declínio até as 48 horas, e continuaram o percurso declinante nas 24 horas subsequentes (Figura 3A). As células cultivadas em meio DMEM HANS F12 tiveram um crescimento contínuo até 48 horas seguido de um declínio discreto até as 72 horas (Figura 3B). O crescimento celular em meio ALPHA MEM foi contínuo até as 48 horas seguida de um discreto declínio até o final do experimento (Figura 3C). A linhagem celular derivada do mesonefro de 28 dias gestacionais, obteve para o meio DMEM HIGH GLUCOSE, certa estabilidade até as 48 horas, seguida de um declínio até o final do experimento (Figura 3D). As células cultivadas em meio DMEM HANS F12 também apresentaram crescimento contínuo até 48 horas seguida de um discreto declínio até 72 (Figura 3E). O meio ALPHA MEM, apresentou um discreto declínio até as 48 horas seguida de uma elevada taxa de atividade metabólica nas 24 horas subsequentes (Figura 3F).

Figura 3 - Análise do metabolismo celular pelo método colorimétrico MTT

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Análise do metabolismo celular pelo método colorimétrico MTT. Em A, B e C, células de mesonefro de 20 dias mostrando a atividade metabólica nas 24, 48 e 72 horas de experimento. Em D, E e F, células de mesonefro de 28 dias gestacionais seguindo os mesmos parâmetros de análises.

As células derivadas do metanefro aos 26 dias gestacionais cultivadas em meio DMEM HIGH GLUCOSE, tiveram alta velocidade de crescimento durante 48 horas, porém reduzida sua taxa de atividade metabólica na mesma frequência nas próximas 24 horas (Figura 4A). As células cultivadas em meio DMEM HANS F12 cresceram continuamente até 48 horas, sofrendo um baixo decréscimo em seu metabolismo, nas 24 horas subsequentes (Figura 4B). O crescimento celular em meio ALPHA MEM foi progressivo até as 48 horas, seguido de uma redução na taxa de atividade metabólica (Figura 4C). A linhagem celular derivada do metanefro de 50 dias gestacionais, obteve para o meio DMEM HIGH GLUCOSE, alta taxa de crescimento durante 48 horas, porém a taxa de atividade metabólica apresentou um declínio nas próximas 24 horas (Figura 4D). As células cultivadas em meio DMEM HANS F12 tiveram um crescimento contínuo durante 48 horas, contudo, apresentaram nas 24 horas seguintes uma redução na taxa do seu metabolismo (Figura 4E). E o ALPHA MEM, apresentou uma alta taxa de crescimento celular até 48 horas seguida de uma redução na taxa de atividade metabólica nas 24 horas subsequentes (Figura 4F).

Figura 4 - Análise do metabolismo celular pelo método colorimétrico MTT

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Análise do metabolismo celular pelo método colorimétrico MTT. Em A, B e C, células de metanefro de 26 dias evidenciando a atividade metabólica nas 24, 48 e 72 horas de experimento. Em D, E e F, células de metanefro de 50 dias gestacionais, seguindo os mesmos parâmetros de análises citados acima.

Em ambas os tipos celulares estudados, provenientes de mesonefro e metanefro de gato doméstico, o meio de cultivo que apresentou uma melhor atividade metabólica foi o ALPHA MEM, pois mesmo apresentava taxas de declínios após as 48 horas de experimento, o número da densidade óptica (D.O) era mais elevado que nos demais meios analisados.

5.3.5 CARACTERIZAÇÃO CELULAR DE CÉLULAS DERIVADAS DO METANEFRO POR CITOMETRIA FLUXO

Os resultados apresentados mediante a técnica de citometria de fluxo, nos mostraram níveis de expressões distintos para diversas proteínas, tais como: anticorpos específicos para proliferação celular, células hematopoiéticas, precursores mesenquimais, complexo principal de histocompatibilidade e para precursores de

células renais. Na sequência segue a média dos valores obtidos por essas proteínas nas diversas linhagens celulares estudados.

A linhagem de mesonefro derivado de embriões de 20 dias gestacionais, foi encontrado um valor positivo para a proteína PCNA (35,7%) responsável pela proliferação celular. Baixa expressão de CD34 (10,9%) precursor hematopoiético e também para as proteínas precursoras mesenquimais CD105 (16,4%) e CD90 (12,7%). Já as proteínas do complexo principal de histocompatibilidade foi observado expressão negativa tanto para MHCI (6,7%) como MHCII (9,4%). E por fim, observamos que os precursores renais apresentaram expressões positivas CD117(30,9%), Nefrina (30,7%), associação de CD117 com Nefrina (65,1%), e baixa marcação de WT1 (13,7%). (Figura 5 A-J).

Na linhagem celular derivada de mesonefro de meio do período gestacional, foi observada que a maioria das proteínas analisadas estão em concordância com a idade anterior, porém se nota que os níveis de expressões são diferentes quando comparado as duas linhagens. Para PCNA (25,4%) encontramos expressão positiva, porém menos expressa que a linhagem anterior. CD34 apresentava valor negativo (6,9%). Já as linhagens precursoras mesenquimais CD105 (29,4%) e CD90 (30,9) foi observado um aumento na taxa de expressão. As proteínas do complexo principal de histocompatibilidade estavam com baixa expressão MCHI (13,7) e expressão negativa MHCII (7,9%). E as proteínas precursoras renais apresentaram expressões positivas CD117 (47,9), nefrina (28,9) porém menores que as linhagens acima e para WT1 (34,2) e associação entre CD117 com Nefrina (65,1) observamos expressão mais elevada quando comparada a linhagem acima (Figura 5 K-T).

Figura 5 - Teste por Citometria de fluxo evidenciando células de mesonefro de 20 e 28 dias gestacionais respectivamente

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Teste por Citometria de fluxo. Inicialmente evidenciamos a linhagem celular derivada de mesonefro de 20 dias gestacionais. Em A marcação para positiva para PCNA proliferação celular. Em B, marcação negativa para CD34. Em C e D, baixa expressão para CD105 e CD90 respectivamente. Em E e F expressão negativa para MHC I e MHCII. Em G, H, I e J expressão positiva para CD117, Nefrina WT1 e Associação entre CD117 e Nefrina respectivamente. Na sequência observamos a expressão dos marcadores presentes na linhagem celular derivada de mesonefro de meio do período gestacional. Em K, expressão positiva para PCNA. Em L, marcação negativa para CD34, em M e N, expressão positiva para CD105 e CD90 respectivamente. Em O e P marcação negativa para MHC I e MHCII respectivamente. Em Q, R, S e T expressão positiva para CD117, Nefrina, WT1 e associação entre CD117 e nefrina.

Para as linhagens celulares derivadas de metanefro tanto de meio quanto de final do período gestacional, foi possível observar uma certa relação entre os níveis de expressão, porém observamos que a linhagem de final do período gestacional apresenta maior expressão dos anticorpos específicos renais, quando comparadas com a linhagem de meio do desenvolvimento gestacional.

Assim sendo, a linhagem derivada de mesonefro de 20 dias gestacionais, obteve marcação positiva para a proteína PCNA (33,7%). Expressão negativa CD34 (5,2%). Expressão positiva CD105 (65,4%) e CD90 (61,9%). Expressão negativa MHC I (6,5%) e MHCII (7,9). Já os marcadores renais foram observados expressão positiva para

CD117(49,5%), Nefrina (17,9%) e associação entre CD117 e Nefrina (24,9%) e expressão baixa para Wt1 (11,4) (Figura 6 A- J).

Por fim, na linhagem derivada de fetos de 50 dias gestacionais, observamos expressão positiva para a proteína PCNA (48,8%). Expressão negativa para CD43 (3,9%). Expressão positiva para CD105 (56,7%) e CD90 (63,6%). Foi observado que no anticorpo MHC1 (16,9) e MHCII (10,9) houve baixa marcação celular. E para todas as linhagens provenientes de progenitores renais, CD117 (94,6%), Nefrina (43,3%), WT1(73,2%) e associação entre CD117 e Nefrina (48,5%), foram observadas altas taxas de marcação positiva (Figura 6 K-T).

Figura 6 - Teste por Citometria de fluxo evidenciando células de metanefro de 28 e 60 dias gestacionais respectivamente

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Teste por Citometria de fluxo. Inicialmente evidenciamos a linhagem celular derivada de metanefro de 28 dias gestacionais. Em A marcação para positiva para PCNA proliferação celular. Em B, marcação negativa para CD34. Em C e D, expressão positiva para CD105 e CD90 respectivamente. Em E e F marcação negativa para MHC I e MHCII. Em G, H, I e J expressão positiva para CD117, Nefrina WTI e Associação entre CD117 e Nefrina respectivamente. Na sequência observamos a expressão dos marcadores presentes na linhagem celular derivada de metanefro derivado de 50 dias gestacionais. Em K, expressão positiva para PCNA. Em L, marcação negativa para CD34, em M e N, expressão positiva para CD105 e CD90 respectivamente. Em O e P baixa expressão positiva para MHC I e MHCII respectivamente. Em Q, R, S e T expressão positiva para CD117, Nefrina, WT1 e associação entre CD117 e nefrina.

5.3.6 POTENCIAL TUMORIGÊNICO DE CÉLULAS DERIVADAS DO MESONEFRO E METANEFRO DE GATO DOMÉSTICO.

As células derivadas do mesonefro de 20 e 26 dias gestacionais respectivamente, foram aplicadas no membro pélvico direito de dois camundongos machos da Linhagem BalbC Nude (Figura 7A e H)). Os animais foram mantidos em biotério por oito semanas, período em que não foram observadas formações tumorigênicas no local da aplicação celular, ou em outras regiões (Figura 7B e I). Após eutanásia, foram realizadas análises histológicas dos pulmões, coração, baco fígado e rim.

Os resultados obtidos para as estruturas pulmonares estiveram dentro dos parâmetros de normalidade. Foi observado que bronquíolos e alvéolos estavam separados entre si pelos septos (Figura 7C e J). Na avaliação do tecido cardíaco (Figura 7D e K) foram observados o endocárdio e as fibras musculares cardíacas. No baço, verificamos que a cápsula de revestimento era constituída por tecido conjuntivo denso e emitia trabéculas para o interior do seu parênquima, dividindo-o em polpa vermelha e polpa branca (figura 7E e L). No fígado foram observadas veias centro lobulares, com delgadas paredes formadas por células endoteliais. Ao redor de cada veia centro lobular estavam presentes capilares sinusóides. Os hepatócitos constituem a maior população celular do fígado, estando dispostos em cordões preenchidos pelos sinusóides (Figura 7 F, M e N). Por fim, foi analisado o tecido renal. Nos túbulos contorcidos proximais observou-se o epitélio cúbico, com margem em escova, diferentemente do túbulo contorcido distal, em que apenas foi evidenciado o epitélio cúbico (Figura 7Ge O). Em maior aumento foi possível averiguar o corpúsculo renal, revestido pela cápsula glomerular e capilares sanguíneos dos quais formavam o glomérulo (Figura 7 P). Todos os órgãos estavam dentro dos parâmetros histopatológicos normais e não apresentaram formação iminente de tumor.

Figura 7 - Teste tumorigênico em camundongo BalbC Nude com células derivadas de mesonefro de 20 e 28 dias gestacionais respectivamente.

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Teste tumorigênico com células progenitoras renais de mesonefro de 20 e 26 dias gestacionais em camundongos BalbC nude. Em A, injeção celular (seta) em camundongo BalbC Nude (N) de mesonefro de feto de gato aos 20 dias gestacionais. Em B, camundongo BalbC Nude após 60 dias mostrando que não houve formação de tumor. Em C, pulmão (Pl). Em D, coração (Co), evidenciando as fibras cardíacas (seta). Em E, Baço (Ba). Em F, Fígado (Fi) e em F, rim (R). Em H, injeção celular (seta) em camundongo BalbC Nude (N) de mesonefro de embrião de 26 dias gestacionais. Em I, camundongo BalbC Nude após 60 dias, mostramos que não houve formação de tumor. Em J, pulmão (Pl). Em k, coração (C). Em L, Baço (Ba). Em M E N, fígado (Fi). Em O e P, rim (R).

Na sequência as células derivadas de metanefro aos 28 e 50 dias gestacionais, foram injetadas em 2 camundongos BalbC Nude macho no membro pélvico direito. Primeiramente, temos a representação dos camundongos dos quais forma aplicados as células provenientes do metanefro de 28 dias gestacionais respectivamente (Figura 8 A, e H). Após o mesmo período de 60 dias, foi realizado o procedimento de eutanásia para

avaliação dos órgãos internamente (Figura 8 B e I). Histologicamente foram analisados os seguintes órgãos: pulmão, coração, baço, fígado e rim.

Parâmetros similares aos citados acima foram encontrados para estes órgãos. O pulmão se encontrava dentro da normalidade (Figura 8 C e J). O coração apresentava as fibras cardíacas e endotélio normais (Figura 8 D e K). No baço foi observado a cápsula de revestimento, constituída por tecido conjuntivo denso, emitia trabéculas para o interior do seu parênquima, dividindo-o em polpa vermelha e polpa branca (Figura 8 E e L). No fígado foram observadas veias centro lobulares, com delgadas paredes formadas por células endoteliais. Ao redor de cada veia centro lobular estavam presentes capilares sinusóides (Figura 8 F, M e N). Nos rins, foram observadas a região corticomedular (Figura 8 G). Em maior aumento foi possível avaliar o corpúsculo renal, revestido pela cápsula glomerular e capilares sanguíneos dos quais formavam o glomérulo. Nos túbulos contorcidos proximais observou-se o epitélio cúbico, com margem em escova, diferentemente do túbulo contorcido distal, em que apenas foi evidenciado o epitélio cúbico (Figura 8 O e P).

Figura 8 - Teste tumorigênico em camundongo BalbC Nude com células derivadas de metanefro de 28 e 60 dias gestacionais.

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Teste tumorigênico com células progenitoras renais de metanefro de 26 e 60 dias gestacionais em camundongos BalbC Nude. Em A, injeção celular (seta) em camundongo BalbC Nude (N) de metanefro de feto de gato aos 26 dias gestacionais. Em B, camundongo BalbC Nude após 60 dias mostrando que não houve formação de tumor. Em C, pulmão (Pl). Em D, coração (Co), evidenciando as fibras cardíacas (seta). Em E, Baço (Ba). Em F, fígado (Fi) e em F, rim (R). Em H, injeção celular (seta) em camundongo BalbC Nude (N) de metanefro de feto de gato aos 50 dias gestacionais na passagem P4. Em I, camundongo BalbC Nude após 60 dias, mostramos que não houve formação de tumor. Em J, pulmão (Pl). Em k, coração (C). Em L, Baço (Ba). Em M E N, fígado (Fi). Em O e P, rim (R).

5.3.7 DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE CÉLULAS DERIVADAS DO DESENVOLVIMENTO RENAL (MESONEFRO E METANEFRO), EM LINHAGENS ADIPOGÊNICA, OSTEOGÊNICA E CONDROGÊNICA.

Para a realização da diferenciação celular adipogênica, osteogênica e condrogênica, as células derivadas de mesonefro de 20 e 28 dias gestacionais e as células de metanefro de 28 e 50 dias gestacionais respectivamente, foram cultivadas por 14 dias em meios de indução (adipócitos, osteócitos e condrócitos). Na diferenciação adipogênica as células apresentaram vesículas adiposas dispersas pelas células. Foram observadas alterações na morfologia celular, quando as células apresentaram formato alongado e núcleo migrando em direção à periferia. Estas células se mostraram diferentes do controle, o qual apresentaram características de células fibroblastóide (Figura 7A a D).

Na diferenciação osteogênica também foram observadas modificações na morfologia celular, caracteristicamente fibroblastóide antes do teste de diferenciação, mas que perdendo suas ramificações e adquiriram pontos de calcificação na matriz extracelular, posteriormente (Figura 7E a H).

E na diferenciação condrogênica, as células apresentaram formato arredondado, característico dos condrócitos, diferindo das células controle (Figura 7I a L).

Figura 7 - Diferenciação celular adipogênica, osteogênica e condrogênica de células do mesonefro de 20 a 28 dias e metanefro de 24 e 60 dias respectivamente

Fonte: (MARIO, L.C., 2019)

Legenda: Diferenciação celular adipogênica, osteogênica e condrogênica de células do mesonefro de 20 a 28 dias e metanefro de 24 e 60 dias respectivamente. Em A e B, C e D diferenciação adipogênica evidenciando vesículas de gordura (seta), morfologia disforme, onde as células perdem o formato fusiforme, adquirindo formato arredondado com núcleo na periferia, observar acima da imagem o controle, evidenciando células em formato fusiforme e com núcleo centralizado. Em E, F, G, H, diferenciação osteogênica evidenciando pontos de calcificação (seta), onde evidencia-se as células com seu formato disforme acima das imagens o controle, evidenciando células em formato fusiforme e com núcleo centralizado. Em I, J, K, L, diferenciação condrogênica evidenciando células em formato arredondado, acima controle mostrando as células em colônias em formato fibroblastóide.

5.4 DISCUSSÃO

Atualmente muito se tem investido em pesquisas que busquem inovações para problemas dos quais não há solução, e que afetam muitos indivíduos na sociedade. Um exemplo disso, são as doenças crônicas para as quais não se tem tratamentos eficazes e que levam muitas pessoas a óbito (Washington, 2013). A terapia celular e a biologia molecular são bons exemplos de alternativas que vem sendo amplamente aplicadas para tais enfermidades. Em especial, as terapias celulares têm sido muito

estudadas pois oferecem diversos prognósticos favoráveis a tais enfermidades, visto que as células liberam fatores anti-inflamatórios e tem importantes ações parácrinas dentro do organismo, demonstrando melhoras significativas nos quadros clínicos dos pacientes (QUIMBY et al., 2011).

Em felinos, uma das maiores casuísticas de mortalidade é proveniente das doenças crônicas relacionadas às patologias renais. Tais enfermidades em estágios mais avançados, não apresentam prognóstico favorável o um tratamento eficaz, levando estes animais a óbito em poucos meses (IRIS, 2016). Com isso, muito estudo vem sendo realizados com finalidade de obter um novo tratamento eficaz para estas doenças. Pesquisas envolvendo células tronco já foram testadas, Quimby et al (2011) testou células de origem mesenquimais e Vidane et al (2016) células oriundas da membrana amniótica, ambos os tratamentos não obtiveram resultados com melhora significativa, apenas pequenas melhoras na qualidade de vida destes animais. Sabendo das inúmeras vantagens das células-tronco, resolvemos investigar uma nova fonte celular, muito promissora, as células progenitoras renais oriundas de mesonefro e metanefro de gato doméstico.

Foram utilizados quatro exemplares de células, provenientes do mesonefro e do metanefro de embriões e fetos de gatos domésticos. O critério para estabelecimento desta seleção considerou a morfologia e organização das estruturas presentes nestes órgãos, visto que para cada fase escolhida, os órgãos estavam num determinado momento de seu desenvolvimento embrionário, evidenciando assim diferentes tipos de estruturas celulares (ABREU et al., 2011; HYTEL, 2012; PIERI et al., 2015). Deste modo, seria esperado que as células progenitoras renais pudessem apresentar diferentes fatores que viessem contribuir com DRC, além daqueles já conhecidos pelas células mesenquimais. Estudos recentes demonstraram que células progenitoras renais contribuíram para o reparo da lesão renal quando testadas *in vivo*. Outros estudos demonstraram que células tubulares conseguiram interagir com componentes epiteliais do néfron, quando transplantadas à um metanefro. Isso vem justificar a importância de novos estudos realizados com células progenitoras, pois se sabe que estas células apresentam melhor capacidade de diferenciação no tecido alvo, quando comparadas aos demais tipos celulares (MAESHIMA et al., 2003; DEKEL et al., 2006; MAESHIMA et al., 2006; KINOMURA et al., 2008; LANGWORTHY et al., 2009).

Antes da realização de qualquer teste clínico com um novo tipo celular, é necessário realizar a caracterização de seus aspectos morfológicos e comportamentais (BROWN et al., 1998). Observamos que as quatro linhagens celulares estudadas, oriundas de mesonefro e metanefro de embriões e fetos de gato doméstico, apresentaram características morfológicas semelhantes, tais como formato fusiforme, núcleo centralizado e citoplasma alongado. O melhor meio para o seu cultivo o ALPHAM MEM, em que apresentaram maior taxa metabólica quando comparado aos demais meios utilizados. Uma possível explicação para isso, é que o meio APLHA MEM, apresenta uma taxa de glicose menor (5,6 nM) quando comparados ao DEMEM HIGH GLUCOSE (25nM) e o DEMEM F12 (17,6 nM), o que nos leva a induzir que estas células necessitam de baixo teor de glicose para sua sobrevivência (STOLZING et al 2006).

Na sequência, estas células foram caracterizadas quanto aos seus parâmetros de imunofenotipagem. Foi observada marcação positiva PCNA, proteína de proliferação celular (MAGA E HÜBSCHER, 2003), nas linhagens derivadas de mesonefro. Observou-se que inicialmente ela demonstrava maior expressão em relação a idade de metade do período gestacional. Isso pode estar relacionado com o fato do mesonefro sofrer regressão, e apenas as partes dos ductos mesonéfricos e paramesonefros seguirem para a diferenciação da porção tubular do sistema reprodutor (ZHAO et al., 2017). Portanto como o órgão em si se degenera, seria esperado observar uma queda nos marcadores de proliferação celular. Já para as duas linhagens de células derivadas do metanefro, foi observada uma expressão equivalente nas duas linhagens para a proteína PCNA. Este fato pode estar relacionado com a característica deste órgão continuar a se desenvolver após o nascimento dos fetos até o terceiro mês de vida (LOURENÇO, 2015). Isso justifica as células ainda apresentarem alta taxa de proliferação celular.

Para a proteína CD34, foi observado que ambas as linhagens celulares estudadas, apresentaram valores baixos de expressão. Esta é uma proteína presente nas linhagens hematopoiéticas e também nas linhagens endoteliais (PUSZTASZERI et al., 2006). Já para as proteínas de origem mesenquimais CD 90 e CD105, foi observada expressão positiva, tanto para células oriundas do mesonefro quanto para as células do metanefro. O CD 90 é uma glicoproteína originalmente identificada em timócitos, altamente expressa em células mesenquimais. Entretanto hoje se sabe que várias linhagens celulares expressaram esta proteína, em diferentes níveis, como por

exemplo fibroblastos e células endoteliais (KISSELBACH et al., 2009). Já a glicoproteína CD105 (endoglina), está associada ao fator de crescimento transformador- β , ela está envolvida no desenvolvimento e remodelamento vascular, proliferação celular, desenvolvimento embrionário e endotélio vascular (MANCINI et al., 2009).

Foi realizada também uma análise para os marcadores específicos de tecido renal, o CD117, (RANGEL et al., 2013), Nefrina (LI E HE, 2015) e o WT-1 (KREIDBERG, 2010). A presença destas proteínas nos cultivos soma-se ao proposto nas hipóteses levantadas, nas quais apresentariam vantagens em relação aos demais tipos celulares, uma vez que elas já demonstram predisposição em diferenciar nas linhagens que necessitamos, ou mesmo auxiliam com fatores que direcionam estes tipos celulares (AGGARWAL et al., 2013). O anticorpo CD117, foi muito bem expresso em todas as 4 linhagens estudadas. Esta proteína é específica para um tipo celular, conhecido por C-kit, o qual foi descrito por Rangel e colaboradores (2013) como um importante precursor renal. Tais autores descobriram que estas células apresentam todas as características de uma célula tronco; quando realizaram testes *ex vivo*, observaram que estas células se relacionavam com vários compartimentos renais, além de contribuir para melhora das funções renais após lesão aguda de isquemia-reperfusão em ratos. Para a proteína Nefrina, também foi observada expressão positiva nos diferentes tipos celulares cultivados. A nefrina é uma proteína chave para os podócitos. Ela é responsável por mediar importantes vias de sinalização celular nos podócitos, além de apresentar um papel importante na manutenção da unidade de filtração glomerular normal no rim. Portanto, a redução nos níveis de nefrina é frequentemente relacionada às diversas doenças renais existentes (LI E HE, 2015). O Wt-1, também foi altamente expresso nas linhagens celulares derivadas de mesonefro e metanefro. Esta proteína apresenta um importante papel nas células progenitoras renais (KREIDBERG, 2010), pois a proteína Wt-1 pode direcionar a formação dos progenitores dos néfrons durante o desenvolvimento renal (HARTWIG et al., 2010).

Na análise da expressão das proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHCI e MHCII), foi observado que para os quatro tipos celulares estudados não houve expressão significativa dessas proteínas. Este dado é muito importante, pois o complexo de histocompatibilidade está relacionado com as defesas do organismo (SHARMA et al., 2017), portanto ter uma expressão dessas proteínas poderia constituir um problema restritivo no que diz respeito às aplicações

terapêuticas destas células. Após a aplicação o próprio organismo do indivíduo entenderia essas células como agentes invasores e acabaria tentando combatê-las (CHAPLIN, 2010).

As células progenitoras renais, mesmo apresentando características que justifiquem sua utilização para tratamento de DCR, necessitam ser seguras em relação a sua capacidade de formar teratomas. Portanto, foi realizado o teste tumorigênico das células progenitoras do metanefro de início e final de gestação. Após dois meses da aplicação celular em camundongo BalbC Nude, não houve formação de tumor, comprovando que estas células são consideradas seguras para terapia celular. Este teste, possibilita o nível de segurança celular antes das mesmas serem aplicadas em animais. É importante ressaltar que em animais, se este teste tivesse sido positivo, não seria recomendado sua aplicação *in vivo* como uma terapia inovadora (FONG et al., 2010). Quando este experimento é realizado em células embrionárias, é observada a formação de tumor após os 2 meses do procedimento de injeção. Assim células derivadas de embriões sem prévia diferenciação, não são aconselhadas para aplicações em seres vivos (YAMAMOTO et al., 2006).

Para averiguar a capacidade de diferenciação em outros tipos celulares, mesmo sendo provenientes de um órgão em formação, as células progenitoras renais foram induzidas *in vitro* a se diferenciarem em outras linhagens celulares. Foi observado que todas as linhagens celulares estudadas, apresentaram a capacidade de se diferenciar nas linhagens adipogênicas, osteogênicas, e condrogênicas, isso se deve ao fato do rim apresentar na sua formação nefrogênica interações entre células do tipo epiteliais e mesenquimais (HYTT EL et al., 2012). Portanto, podemos concluir que as células derivadas do mesonefro e metanefro em diferentes fases gestacionais, apresentam excelentes potenciais terapêuticos para serem aplicadas como testes de investigação das DRC em felinos. Estas células são de fácil cultivo, apresentam plasticidade e clonicidade para terapia celular, diversos marcadores específicos para o tecido renal, e não apresentam expressão de MHC I e II. Também não apresentam potencial tumorigênico e podem se diferenciar em linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas. Com todos estes padrões bem definidos estas células podem constituir uma nova fonte para o estabelecimento de novas terapias celulares para tratamento de gatos domésticos com DRC.

REFERENCIAS

ABREU, D. K. et al. Estudo microscópico e macroscópico, com enfoque radiográfico e de alizarina, no desenvolvimento embrionário e fetal de gatos domésticos (*Felis catus*) em diferentes idades gestacionais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. a00101s1, p. 57-66, 2011.

AGGARWAL, S.; MOGGIO, A.; BUSSOLATI, B. Concise review: stem/progenitor cells for renal tissue repair: current knowledge and perspectives. **Stem cells translational medicine**, v. 2, n. 12, p. 1011-1019, 2013.

BANFIELD. 2017. Banfield Pet Hospitalar. Kidney Disease. Disponível em: <https://www.banfield.com/our-hospitals/hospital-locations?ll=-23.5715938,-46.742553499999985&q=05362-020>. Acesso: 15 janeiro de 2017.

BARBER, P. Diagnosis and management of chronic renal failure in the cat. **In practice**, v. 25, n. 6, p. 306, 2003.

BROWN, F. et al. Quality of biotechnological products: Derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological. **Developments in biological standardization**, n. 93, p. 223-234, 1998.

CARDOSO, M. T. et al. A melhor fonte de células-tronco: o âmnion do cão e do gato. **Acta Vet. Brasilica**, v. 8, n. 2, p. 269-274, 2014.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S3-S23, 2010.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. Urologia e nefrologia do cão e do gato. (tradução) 2.ed. **Rio de Janeiro: Saunders-Elsevier**, 2012. 540 p.

DEKEL, B. et al. Isolation and characterization of nontubular sca-1⁺ lin⁻ multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 12, p. 3300-3314, 2006.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 2, n. 1, p. 11-45, 1973.

FONG, C.; GAUTHAMAN, K.; BONGSO, A. Teratomas from pluripotent stem cells: a clinical hurdle. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, n. 4, p. 769-781, 2010.

HARTWIG, S. et al. Genomic characterization of Wilms' tumor suppressor 1 targets in nephron progenitor cells during kidney development. **Development**, v. 137, n. 7, p. 1189-1203, 2010.

HYTTEL, P.; SINOWATZ F.; VEJLSTED M. **Embriologia veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2012, p. 252-285.

IRIS- International Renal Interest Society. 2016. Treatment Recommendations for CKD in cats 2015. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/pdf/treatment-recommendation-cats.pdf> . Acesso em: 16 janeiro de 2017.

KINOMURA, M. et al. Amelioration of cisplatin-induced acute renal injury by renal progenitor-like cells derived from the adult rat kidney. **Cell Transplantation**, v. 17, n. 1-2, p. 143-158, 2008.

KISSELBACH, L. et al. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. **Cytotechnology**, v. 59, n. 1, p. 31-44, 2009.

KREIDBERG, J. A. WT1 and kidney progenitor cells. **Organogenesis**, v. 6, n. 2, p. 61-70, 2010.

LANGWORTHY, M. et al. NFATc1 identifies a population of proximal tubule cell progenitors. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 2, p. 311-321, 2009.

LI, X. Z.; HE, J. C. An update: the role of Nephrin inside and outside the kidney. **Science China Life Sciences**, v. 58, n. 7, p. 649-657, 2015.

LOURENÇO, M. L. G. Cuidados com neonatos e filhotes. In: JERICÓ, M.M.; NETO, J.P.A.; KOGIKA, M.M. Tratado de Medicina Veterinária de Cães e Gatos. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 363-475.

MAESHIMA, A.; SAKURAI, H.; NIGAM, S. K. Adult kidney tubular cell population showing phenotypic plasticity, tubulogenic capacity, and integration capability into developing kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 1, p. 188-198, 2006.

MAESHIMA, A.; YAMASHITA, S.; NOJIMA, Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 12, p. 3138-3146, 2003.

MAGA, G.; HÜBSCHER, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. **Journal of cell science**, v. 116, n. 15, p. 3051-3060, 2003.

MANCINI, M. L. et al. Endoglin plays distinct roles in vascular smooth muscle cell recruitment and regulation of arteriovenous identity during angiogenesis. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 238, n. 10, p. 2479-2493, 2009.

PIERI, N. C. G. et al. Comparative development of embryonic age by organogenesis in domestic dogs and cats. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, n. 4, p. 625-631, 2015.

PUSZTASZERI, M. P.; SEELENTAG, W.; BOSMAN, F. T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 54, n. 4, p. 385-395, 2006.

QUIMBY, J. M. et al. 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, 2011.

QUIMBY, J. M. et al. 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 & therapy**, v. 4, n. 2, p. 48, 2013.

RAFII, S.; LYDEN, D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 702, 2003.

RANGEL, E. B. et al. C-Kit⁺ Cells Isolated from Developing Kidneys Are a Novel Population of Stem Cells with Regenerative Potential. **Stem cells**, v. 31, n. 8, p. 1644-1656, 2013.

SCHMIEDT, C. W. et al. Unilateral renal ischemia as a model of acute kidney injury and renal fibrosis in cats. **Veterinary pathology**, v. 53, n. 1, p. 87-101, 2016.

SHARMA, P.; KUMAR, P.; SHARMA, R. The major histocompatibility complex: a review. **Asian Journal of Pharmacology Clinical Research**, v. 10, n. 2, p. 33-36, 2017.

STOLZING, A.; COLEMAN, N.; SCUTT, A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. **Rejuvenation research**, v. 9, n. 1, p. 31-35, 2006.

TOLOSA E. M. C.; RODRIGUES C. J.; BEHMER O. A.; NETO, A. G. F. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2ª ed. Manole, São Paulo, 2003. p.331.

TOGEL, F. et al. 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, 2005.

VANDEN, S. L. Glomerular Disease. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, 128-134p, 2011.

VIDANE, A. S. et al. Transplantation of amniotic membrane-derived multipotent cells ameliorates and delays the progression of chronic kidney disease in cats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 316-326, 2017.

ZHAO, F. et al. Elimination of the male reproductive tract in the female embryo is promoted by COUP-TFII in mice. **Science**, v. 357, n. 6352, p. 717-720, 2017.

WAKI, M. F. et al. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos: abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciência rural**, v. 40, n. 10, 2010.

WASHINGTON, D. C. Innovative care for chronic conditions: organizing and delivering high quality care for chronic noncommunicable diseases in the Americas. Pan American Health Organization. 51p. 2013.

WOO, P. C. Y et al. Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201119972, 2012.

YAMAMOTO, M. et al. Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 290, n. 1, p. F52-F60, 2006.

APÊNDICE

MARIO, Lara C. et al. Development of urinary organs in domestic cat during the embryonic and fetal periods. *Microscopy research and technique*, v. 81, n. 11, p. 1286-1294, 2018.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jemt.23135>

* A reprodução deste artigo obteve autorização pela Microscopy Research e Technique (Wiley). License number: 4506050027845

Received: 9 May 2018 | Revised: 9 August 2018 | Accepted: 27 August 2018
DOI: 10.1002/jemt.23135

WILEY MICROSCOPY RESEARCH TECHNIQUE

Check for updates

RESEARCH ARTICLE

Development of urinary organs in domestic cat during the embryonic and fetal periods

Lara C. Mario¹ | Maíara P. Moraes¹ | Jessica Borghesi¹ | Phelipe O. Favaron¹ | Franceliusa D. Oliveira¹ | Adriana R. A. Anunciação¹ | Rafael G. Agopian² | Samirah A. Gomes³ | Maria A. Miglino¹

¹Sector of Wild and Domestic Animals Anatomy, College of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo FMVZ/USP, São Paulo, Brazil
²Sector of Wild and Domestic Animals Anatomy, College of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo FMVZ/USP, São Paulo, Brazil
³Department of Clinical Medicine College of Medicine of the University of São Paulo FMF/USP, São Paulo, Brazil

Correspondence
Lara C. Mario, Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, 05508-270, Butantã, São Paulo, Brazil.
Email: lara.mario@usp.br

Review Editor: Perry George
Funding Information
CAPES, FAPESP

Abstract
The embryonic origin of the urogenital system came from the intermediate mesoderm. Kidney development involves three successive renal systems with a fast chronological overlap: the pronephros, the mesonephros, and the metanephros. Due to the lack of specific knowledge about this system in cats the present work aimed to describe their urinary organs development, focusing on the structures seen in pronephros, mesonephros, and metanephros during the embryonic and fetal stages of development. The techniques used in this study were: light microscopy, immunohistochemistry, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy. For that, embryos and fetuses from 12 pregnant mixed-breed domestic cats in different gestational stages were used to describe the proposed organs. The pronephros is present at early stages of embryonic development in embryos from 15 to 19 days with the presence of pronephros capsules, ducts and tubules. The mesonephros is found, in general, between days 17 and 37, and contains mesonephric ducts, mesonephric tubules, and glomeruli. The metanephros is seen since 21 days of pregnancy with the presence of glomeruli, proximal and distal convoluted tubules and at day 37, the corticomedullary region is already differentiated. The evaluation of these structures enhances the knowledge about embryology of the urinary system in cats, aiding a better anatomical understanding of the system in the specie allowing the correlation with other species.

KEYWORDS
developmental biology, embryology, fetus, microscopy, morphology

1 | INTRODUCTION
The cats (*Felis catus*, Linnaeus 1758) present renal diseases as the second major cause of mortality in the species (Pobis, Osborno, & Ross, 2010). Among the main kidney diseases, we can name the polycystic kidney disease, chronic kidney disease, feline idiopathic cystitis, and others (Junier & Haglwara, 2004). All the diseases related to this system can progress to kidney insufficiency and, consequently, kidney failure (Castro, Marcello, Alencar, & Ferreira, 2009; Cherv, Dibartola, & Schenck, 2011; King, Tasker, Gunn-Moore, & Strehlau, 2007; Lefebvre, 2011; Mesquita et al., 2014; Pobis, 2007). According to data reported by The Brazilian Industry of Pet's Products Association (Abinpet), in 2013 people has spent 15.2 billion of reais with pets' health in Brazil. Brazil has a population of 21.3 million cats, ranked as the second largest market in the world of pets (Abinpet, 2015).
According to the American Humane Association (2012) kidney diseases in cats are one of the most seen diseases in veterinary clinics and the most common cause of death in older cats is chronic kidney disease, affecting 1 in 12 cats have this condition (Senra, 2014). The Banfield Veterinary Hospitals Network in the United States reported 1.5% of patients diagnosed with chronic kidney disease out of all patients attended in 2010, 81% of whom were aged 10 years or older. It is relevant to say that, if we take data from 2006 to 2011, we see that the cases bent passing from 80 to 160 thousand cases (Lefebvre, 2011).

Lara C. Mario and Maíara P. Moraes contributed equally to the work.

The urinary system is composed by the kidneys, ureters, urinary bladder, and urethra. Together it acts to produce, regulate, and excrete metabolic fluids. Thus, the urinary organs function consist in excreting residues through the urine production, besides promoting the organism homeostasis through the removal and reabsorption of electrolytes, water, glucose, and proteins (Dyce & Sack, 2010).

The embryonic origin of the urogenital system came from the intermediate mesoderm, located between the somites and the lateral mesoderm (Calkin, 1994; Almeida, 1999; Moore & Persaud, 2008). The renal tubules have their own characteristics and three successive renal systems appear with a fast chronological overlap: the pronephros, the mesonephros, and the metanephros (García & Fernández, 2001).

The pronephros is composed by cellular clusters located in the cervical region (Sinowatz, 2010). In the beginning of development, the pronephros degenerates, followed by its system degeneration as well, but the mesonephros, development phase that succeeds the pronephros, uses most of the pronephros ducts as scaffold. As the pronephros system degenerates, the first mesonephric tubules begin to emerge (Sainio & Ahlqvist, 1999). According to García and Fernández (2001), in *Felis catus*, there seems to be some mesonephros functionality during cat's fetal life. In the case of domestic cats, at 19th gestational day, the mesonephros is already formed, suggesting that the pronephros develops and regresses rapidly in initial stages of the embryonic period.

Metanephros, the permanent kidney, begins to develop when the mesonephros regresses. The metanephros is the definitive kidney in mammals (Sinowatz, 2010). These kidneys, that were initially located in the pelvic region, gradually migrate toward the abdomen cranially. The lengthening of the initial portion of its duct forms the ureter. In fetuses with 52 days of age, the metanephros is already well established, with the presence of the cortical and medullary regions, and well-defined structures (Abreu et al., 2011).

The goal of this work was to enhance the knowledge about embryology of the urinary system in cats through the detailed description of its main components, correlate macroscopic and microscopically characteristics, thus, aiding a better anatomical understanding of the system in the species and allowing the correlation with other species.

2 | MATERIALS AND METHODS

Twelve pregnant mixed-breed cats (*Felis catus*, Linnaeus 1758) at different gestational stages, were used, in order to observe the embryonic development of the urinary organs. The animals were obtained from neutering campaigns. The organs from embryos and fetuses were separated into three gestational stages (beginning, middle, and end), considering the gestational period of 63 days. This work has followed the criteria required by the Bioethics Committee of the Veterinary Medicine and Animal Science College of the University of São Paulo (Nº 97981/0215).

2.1 | Macroscopic evaluation

The ages of the embryos and fetuses were estimated according to their measurements by the method crown-rump and their external characteristics described by Evans and Sack (1972) with adaptations

confronting the data from Knappe (2002), Abreu et al. (2011), and Pirel et al. (2015) before fixation.

2.2 | Light microscopy

Twenty-four embryos and 12 fetuses were fixed in 4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde. After fixation, the material was dehydrated in ethanol solutions of rising concentrations (70–100%), followed by diaphanization in xylol and posteriorly the whole embryos up to 20 days and the organs of the embryos and fetuses after 21 days were embedded in paraffin (Histowax) (Tolosa, Rodríguez, Behner, & Nieto, 2008).

The paraffin blocks were sliced in an automatic microtome (Leica, RM2165, Germany) obtaining 5 µm slices, which were added to histological slides. After being deposed from the paraffin, the slices were stained in Hematoxylin and Eosin, and in Periodic Acid-Schiff. After that, the slides were analyzed and the morphologic characteristics photo-documented using a Nikon Eclipse 80i microscope.

2.3 | Scanning electron microscopy

The electronic scan microscopy was performed on kidney samples from three embryos and six fetuses, which were fixed in 2.5% glutaraldehyde, and post-fixed in 1% osmium tetroxide followed by dehydration in a crescent series of alcohol solutions (70–100%). The material was fixed in stubs, dehydrated to dry at a critical point (Roberts CPD 000), and metallized in gold (sputtering Emitech K550). The results were analyzed using the electronic microscope ME Leo 435 VP.

2.4 | Transmission electron microscopy

To the ultrastructural evaluation, fragments measuring about 0.5 cm² were obtained from different regions of the metanephros and mesonephros of 3 embryos and 6 fetuses. The material was fixed in 2.5% glutaraldehyde solution buffered with 0.1 M sodium phosphate in a 7.4 pH. After fixation, the material was washed in a sodium phosphate (0.1 M pH 7.4) buffer. Subsequently, post-fixation was performed in 2% osmium tetroxide for 2 hr. After this procedure, the fragments were washed in buffer solution three times for 10 min each. They were then immersed in saturated aqueous uranyl acetate for 1 hr, washed in buffer and submitted to dehydration in ethyl alcohol in increasing concentrations.

The fragments were washed in propylene oxide for 10 minutes, and after that infiltration in araldite 502 - Polycondensers started. The fragments were immersed in a 1:2 mixture of propylene oxide and araldite for 1 hr, 1:1 mixture for 12 hr, pure araldite for 4 hr and finally in pure araldite plus activator, in order to make the blocks, and put in the incubator at 60°C for 3 days.

When the blocks were obtained, 0.4 µm semi-thin sections were prepared in an automated ultramicrotome (Ultracut R, Leica Microsystems - Germany), hot-stained in 1% Toluidine blue aqueous solution to identify their regions using a light microscope, and then to obtain ultrathin sections. The 0.07 µm thick sections were collected on copper screens and contrasted with 2% saturated uranyl acetate for 7–10 min and then in 0.5% uranyl citrate over the same period used for uranyl acetate. The material was analyzed by transmission electron microscopy (Morgagni268D, FEI Company, The Netherlands;

TABLE 1 Analysis of the external characteristics of embryos and fetuses of cats. Division of the samples according to the biometric and morphological data, based on Evans and Sack (1972) (n = 12)

Gestational days	Weight (g)	Crown-rump (cm)	External characteristics
15	0.11	0.5	Beginning of somite formation, cardiac protrusion, four branchial arches, stomodaeum, absence of optic vesicle and optic.
17	0.11	0.8	Twisting of the caudal extremity, onset of optic vesicle pigmentation, bud of the thoracic and pelvic limbs, and of mesencephalic region in formation.
19	0.16	1.1	Head touches the cardiac eminence, presence of the optic vesicle, olfactory placode and formation of the forelimb bud with a shovel form, and hind limb is present.
20	0.33	1.1	Optic vesicle, stomodaeum, division of the forelimb digits begins.
21	0.48	2.1	Physiological umbilical hernia, eyes are well formed and pigmented, forelimbs exhibit interdigital membranes, hind limbs without digits separation.
22	1.54	2.5	Beginning of mammary glands formation, curved pale, separation of digits and indication of ribs presence.
24	3.34	3.1	They present the digits of the pelvic limb separated distally, tactile follicles present on the lips, primordium of the mammary glands.
26	6.28	3.8	Hair follicles and eyelids forming, division of digits in the pelvic and thoracic limbs, primordia of claws in pelvic and thoracic limbs.
28	19.38	4.5	Tactile follicles, separation of digits, visible tongue, closure of the eyelids and claw formation.
37	30.52	7.5	Eyelids, swollen palate and tactile.
50	43.38	9.3	Beginning of hair development.
60	136.76	12	All characteristics formed, pigmentation of the hair, hard and white claws.

MegaView III camera, Soft Imaging, Germany) and different regions of the kidneys were characterized and electronmicrographed.

2.5 | Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed in mesonephros and metanephros from three feline embryos and nine fetuses using the following markers: PCNA (sc-56 1:100, proliferating cell nuclear antigen, clone PC10, St. Louis); CD9 (Serotec D895 1:100, monoclonal for feline, UK); Caspase 3 (sc-271759 1:100, mouse monoclonal, Santa Cruz, antibody Inc. Europe); Islectin, (B21411 1:100, Islectin B4 Biotin Conjugates Antibody), according with the protocol routinely applied in our laboratory (Oliveira et al., 2012). The negative control of the reactions used the IgG/Gest anti-Mouse IgG - AP 200F, Chemical International.

3 | RESULTS

3.1 | General external characteristics of embryos and fetuses

The results observed through evaluation of the external characteristics of embryos and fetuses were described, in chronological order of gestational days (Table 1).

3.2 | Macroscopic and microscopic evaluation of the urinary organs

The urinary structures, in embryos with 19 days of gestation the mesonephros presented mesonephric ducts dorsally, mesonephric tubules caudally, and the glomeruli ventrally (Figure 1a). Macroscopically, the mesonephros was observed by dissection (Figure 1a), and by the scanning electron microscopy was possible to verify the pronephros—illustrating the transition from pronephros to mesonephros

(Figure 1b). The corpuscles, ducts and tubules observed in the pronephros had a simple cuboidal epithelium structure (Figure 1b). It was noted that they had more rounded cells that were close to each other. Mesonephros had a simple columnar epithelium in the glomerulus, simple cuboidal epithelium in the ducts and tubules, which were more elongated and dispense (Figure 1c). On the other hand, the 22 days embryo had the transitioning mesonephros from his elongated form to oval form. Cranially, it was seen the gonad and adjacent to it the early stage metanephros. Microscopically it was seen the three structures that compose the mesonephros: glomeruli, tubules and ducts (Figure 1d).

In a 22 days old embryo the beginning of metanephros development was evidenced. Macroscopically the metanephros was smaller than the mesonephros and at this stage both were anatomically united (Figure 1e). None of its structures are possible to differentiate in the sagittal plane. Microscopically the metanephros was at early stage of glomerulogenesis, where the parenchyma was initiating its differentiation (Figure 1h). An embryo of 24 days—half of cat's pregnancy—was used to evaluate the other structures macroscopically. At this stage it was seen the ureter, urinary bladder, and urethra in development (Figure 1j–m).

At 28 days, half of embryonic development, the mesonephros was well developed and in oval form (Figure 2a). Light microscopy could evidence the glomeruli, the mesonephric tubule and the mesonephric duct, where was observed a simple pavement epithelium in glomeruli and a simple cuboidal epithelium in other structures (Figure 2b,c). The same structures were evidenced by scanning electron microscopy and it was possible to observe that the urinary space inside the glomeruli is smaller in the mesonephros in comparison to metanephros (Figure 2d).

In contrast to the beginning of development, the 28-day metanephros was larger than the mesonephros and had a format characteristic of the adult organ. At this stage it was not possible to observe

FIGURE 1 Macroscopic and microscopic evaluation of urinary organs from embryos of cats in early pregnancy. In (a), the mesonephros (Me) of 19 days of pregnancy in macroscopic evaluation. In (b), scanning electron microscopy evidencing the Me with 19 days of pregnancy. At this stage it could be evidenced the Me and the proximal tubule (Pt). In (c), it could be noticed the increase of Pt's structures. In (d), light electronic microscopy of embryos with 19 days evidencing the Me and Pt. In (e), embryo with 22 days evidencing the developed Me in oval form, and the metanephros (Mt) begins its development; however it was already in the form of a bean. In (f–g) embryos with 22 days evidencing the beginning of Mt's development with the presence of Me in (f) and (g). In (h) and (i), light microscopy showing the structures present in the Mt of 22 days. In (j), macroscopic evaluation of the urinary organs from embryos with 24 days. Mt, Me, ureter (arrow), urinary bladder (B), and urethra (u). In (k), 24 days, ureter with cubic epithelium (CE) and lamina propria (LP). In (l), 24 days, urinary bladder with transitional epithelium (TE) and lamina propria (LP). In (m), 24 days, urethra with an epithelium layer (ep) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

FIGURE 2 Macroscopic and microscopic evaluation of urinary organs from cat's embryo at mid-gestation. In (a), the Mt and Me are both present, but the Me is well developed and in an oval form. In (b) and (c), Me containing glomeruli (g), mesonephric duct (md), and mesonephric tubule (mt). In (d), glomerulus (g) with decreased urinary space, mesonephric tubule (mt) and mesonephric duct (md). In (e), Mt showing that the kidney was not divided into cortex and medulla. In (f) and (g), embryo with 28 gestational days where in (f) the Mt don't exhibit a division of cortex and medulla, the glomeruli (g) are present along the entire structure and in (g), glomerulus (g), proximal contorted tubule (act) and distal contorted tubule (dct). In (h), renal corpuscle (rc) and urinary space (arrow) visualized by scanning electron microscopy technique. In (i), all the urinary organs are present: Mt, ureter (u), urinary bladder (B) and urethra (ut) including the presence of the Me. In (j), ureter evidencing transitional epithelium (TE) and connective tissue (CT). In (k), urinary bladder evidencing transitional epithelium (TE), connective tissue (CT) and muscle layer (ML). In (l), urethra evidencing transitional epithelium (TE) and connective tissue (CT) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

FIGURE 3 In (a) and (b), embryos of 27 gestational days—note the Me regression (arrow). In (c) and (d), Me's histology from an embryo of 27 gestational days evidencing glomerulus (g), tubules (t) and ducts (d) degenerating. In (e), 50 days, Me divided in cortical (C) and medullary (M) regions, it is also possible to observe the pseudo-papilla (pp), renal crest (black arrow) and the renal pelvis (P). In (f), scanning electron microscopy of the Me at 50 days, which is divided in cortical region (C) with the presence of glomeruli (g) and medullary region (M) with presence of tubules (t). In (g), kidney at 50 days divided in cortex (C) and medulla (M). In (h), Me of a fetus at day 50 of gestation illustrating the difference between the proximal tubules (pt) that presented a more pronounced staining in the brush border (arrow) and distal convoluted tubules (dct). In (i), renal capsule composed by the glomerulus (g) and by the glomerular capsule that is formed by two folds, the parietal (white arrow) and the visceral (black arrow). In (j), a glomerulus and glomerular capillary (black arrow) covered by endothelial cells (white arrow) and filled by the mesangium (*). In (k), renal capsule (rc) visualized through scanning electron microscopy technique. In (l), medullary region (me) and tubular region composed by collecting tubules (ct), thick and thin segments of the nephron's loop of Henle, interstitium (*) and collecting ducts (cd). In (m), it can be seen the Me, urinary bladder (b), ureters (u), and urethra (ue) completely formed. In (n), ureter with transitional epithelium (TE) and collagenous lamina propria (lcp), covered by two layers of smooth muscle, arranged internally as a spiral called longitudinal layer (ll) and externally as a circular layer (cl) that, on the other hand, is divided by a loose collagenous adventitial layer (tunica adventitia) (alc). In (o), at 60 days, the urinary bladder is covered internally by a transitional epithelium (TE), lamina propria (LP) and dense connective tissue (dct), submucosa propria (sp) and three layers, the first (*), second (**) and third (***). In (p), urethra composed by epithelium (ep) and connective tissue (CT) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Differentiation of cortex and medulla yet, which was proven both macroscopically (Figure 2e) and microscopically where there are glomeruli present throughout the structure (Figure 2f,g). Microscopically the glomeruli, proximal tubule and distal tubule were evident, besides the renal capsule with evident urinary space (Figure 2h).

Analyzing the other structures of the urinary tract, it was concluded that these structures were developed, but not completely (Figure 2i). In the urinary bladder was observed the transitional epithelium, a layer of connective tissue and only one muscular layer (Figure 2j). The urethra had a layer of epithelium and connective tissue, and the ureter had a tubular form (Figure 2k,l).

The analysis of the third stage of development show us that the metanephros regressed at 27 gestational days (Figure 3a,b). Microscopically, it can be observed that the structures began to degenerate, but it was still possible to detect the presence of glomeruli, tubules and mesonephric ducts (Figure 3c,d).

The metanephros was already divided into cortical and medullary regions; it was also possible to observe the pseudopapilla, renal crest,

and renal pelvis (Figure 3e,f). In the microscopic analysis, the renal capsules, proximal and distal convoluted tubules. Through periodic acid staining of Shif the proximal convoluted tubules were strongly stained, because this coloring marks the glycocalyx present in the microvilli that make up the brush border of the proximal convoluted tubules (Figure 3g,h). In sequence, it was noted in the renal capsule, the afferent arteriole entering the glomerulus, the urinary pole and convoluted proximal tubule. The renal capsule was composed by the glomerulus and the glomerular capsule that presented two leaflets, the parietal and the visceral. The glomerulus had glomerular capillary coated by endothelial cells and was filled by mesangium (Figure 3i-j). In the medullary portion it was observed the tubular region, composed of the collecting tubules, segments of the thick and thin nephron loop, interstitium and collecting ducts (Figure 3k).

Analyzing the other structures of the urinary system, at 50 days, metanephros, bladder, ureters and urethra were present and fully formed (Figure 3m). The bladder was found with transitional epithelium below own blade and dense connective tissue after these layers,

FIGURE 4 Evaluation through transmission electron microscopy of early and final stages of the Ms. Panels (a–c) show the Ms at early stage of development, where it is possible to see in (a), podocytes (p) and blood capillaries (c). In (b), an amplified image of podocytes evidencing mitochondria (m), cytoskeleton (c) and nucleus (n). In (c), mesangial cells (mc). In (d), note the Ms at end-stage of development, in which it is possible to notice its degeneration, suggested by the presence of vacuoles (*) and lysosomes (arrow). In (e), Ms in early development evidencing glomeruli (g), blood capillaries (c) and mesangial cells (mc). In (f), capillaries (c) and blood cells (RBC). In (g), proximal convoluted tubule (pct) evidencing the brush border (arrow). In (h), distal convoluted tubule (dct). In (i), glomerulus from the final Ms, in which it is possible to see blood capillaries (c), podocytes subdivided in cellular body (*) and foot extensions (arrow), and red blood cell (RBC)

submucosa and three layers of smooth muscle (Figure 3a). In the ureter it was detected epithelium and connective tissue (Figure 3a). In the ureter it was possible to see transitional epithelium or urothelium, lamina propria collagen, coated with two layers of smooth muscle, arranged as an internal spiral, called a longitudinal layer and another layer called a circular layer, which, in turn, was surrounded by a loose collagenous adventitial layer (Figure 3a).

Other data were obtained by the transmission electron microscopy technique, in which it was possible to see the types of cells and organelles present in the nephron. In the mesonephros, in the beginning and middle of gestation was possible to observe the podocytes in the glomeruli, mesangial cells and glomerular capillaries (Figure 4a–c). However, at term the mesonephros had cells that were degenerating, not been possible to observe cellular delimitations (Figure 4d). In the sequence, the metanephros is present from beginning to mid gestation until term, and was possible to notice glomeruli with podocytes, mesangial cells and blood capillaries (Figure 4e–i). The cells had nucleus and nucleolus, and in the cytoplasmic region mitochondria were evidenced. Tubular region was also observed, where distal and proximal convoluted tubules were distinguished. The proximal convoluted tubule presents a brush border in its epithelium differently from the distal tubule that doesn't have (Figure 4g–h).

The immunohistochemistry analysis of the mesonephros and metanephros complex from days 22, 28, 37, and 50 of pregnancy showed positive immunolabeling to lectin, a marker of neo-vasculogenesis present in the tubules and glomeruli (Figure 5a–g). The expression of markers for embryonic cells (ICV) and cell proliferation (PCNA) during

kidney development was positive in the mesonephros and metanephros from embryos and fetuses of 28 and 50 gestational days. Thus, for the ICV marker, was only expression in the mesonephros that is in a more primitive stage than the metanephros (Figure 5b–f). For the PCNA, both the mesonephros and metanephros had positive expression, showing that both stages had cell proliferation (Figure 6a–d). Through the Caspase2 marker it was possible to see cellular degeneration from mesonephros at 27 days of pregnancy, which was the only day that had positive expression (Figure 6e–h).

4 | DISCUSSION

For this study, the organs from embryos and fetuses were separated into three gestational stages, considering the gestational period of 63 days as described by Evans and Sack (1973). This didactic division enables that each organ is best evaluated.

The methodology described by Evans and Sack (1973) for the identification of the embryonic development of the cat, aims only to describe the specific gestational ages according to the main structures present in each of these phases. In that methodology, there are intervals that are not mentioned and knowing that the gestational period in this species is 60 days, in small fractions of time, new structures are formed. To describe them more accurately it would be necessary to study a larger number of animals with smaller gestational intervals using the time line embryo development method, but, for this, it would have many euthanized animals. According to the norms

FIGURE 5 Immunohistochemistry of domestic cat's embryos and fetuses. In (a–g), positive staining for Isolectin, a neo-vasculogenesis marker seen in tubules and glomeruli (arrow) in Mx from days 22, 28, and 37, and Mt with 22, 28, and 50 days respectively. In (h–j), positive staining for CD9 (arrow) in Mx from days 28 and 37, respectively. In (k) and (l), there was no positive staining for CD9 in Mt from days 28 and 50, respectively [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

established by the ethics committee, this action would not be possible, thus unfeasible to carry out further studies in this sense.

In this study, were used embryos and fetuses from the neutering campaign carried out in the city of São Paulo, SP, Brazil. The pregnant females were all mixed-breed and were between 1 and 6 years of age. According to Lyons and Kurushima (2012), the majority of the world cat population is classified as mixed-breed, but show similar characteristics, presenting no great differences in their size and weight, being possible to reproduce among them, so the comparison between these animals can be performed without any significant change in the data.

At the first stage, the embryos of 19 and 20 days are very similar to each other, and to classify them the criterion used was the forelimb development, since at 19 days the forelimbs were in a shovel form whereas at 20 days they had membranes seen at initial stages of digits division (Evans & Sack, 1973).

Microscopically, at initial stages of domestic cat's embryonic development it was observed the presence of the primitive kidney or pronephros which has similar structures seen in the pronephros of the fishes such as pronephric ducts, pronephric tubules, and pronephric capillaries (Jørg, Larsen, & Jeppesen, 1996). In mammalian the pronephros is functional and is seen only in a brief period before

FIGURE 6 Immunohistochemistry of domestic cat's embryos and fetuses. In (a–d), positive staining for PCNA, a marker of cell proliferation, (arrow) in Mx from days 28 and 37, and Mt from days 28 and 50, respectively. In (e–h), reaction to caspase 3 in Mx from days 28 and 37, and in Mt from days 28 and 50, respectively, which it was only positive in the Mx of 37 days [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

regressing (Knope, 2002). The pronephros is an evolutionary feature inherited from fishes where it is the definitive kidney. The mesonephros, the second embryonic kidney found in mammals, presents a functional phase in the embryonic period (Sinsawat, 2010). To amphibians, the mesonephros is functional in adulthood exhibiting similar characteristics of a domestic cat mesonephros (Rijevic et al., 1998). The importance of studying these characteristics in the beginning of cat's development is based in the lack of information in the literature, which make these data valuable regarding the knowledge of the species studied as well as enables to correlate with other species.

On the other group, the macroscopic findings were better correlated with the described by Evans and Sack (1973), and in embryos with 21 gestational days that presented hemisected intestines through the umbilical cord the main factor leading the hembra formation is the size of the mesonephros (Sinsawat, 2010). Embryos of 22 days presented beginning of mammary glands development, while embryos of 26 days had separation of hind limbs digits and no externalization of the tongue that is a characteristic of embryos with 27 days. An important data found in this study was the oval form of the mesonephros and the bean form of the metanephros in early development. Relating these data with the obtained by Knope (2002), it could suggested that there is a relation with the days that the mesonephros is still present in the embryonic development, from 15/17 days to 34/44 being the peak of its development, in average, from 27 to 30 days (Tiedemann, 2012).

At 28 days there is the last embryonic stage. At this stage it possible to see the eyelids closure and claws formation (Evans & Sack, 1973). All the organs of the urinary tract are present macro and microscopically. At this stage, the kidney is not complete yet; the mesonephros and its structures are very evident as described in data from Tiedemann (2012), which explain that in fetuses of cats with 28 days is observed only glomeruli completely formed and functional, without any immature glomerulus or in degeneration process. Metanephros was not differentiated in cortical and medullary regions; these data were confirmed by light microscopy, where glomeruli are found throughout the structures.

Following the chronology proposed by Evans and Sack (1973), fetuses of 27 days had tactile hair on the face and macroscopically the mesonephros is regressing whereas the metanephros is developing. However, it was not possible to differentiate the cortical and medullary regions. Data of mesonephros regression agree with what is reported by Tiedemann (2012) that verified apparent changes on the regression of the organ. It is noteworthy to mention that the structures degenerate and do not migrate to the metanephros, and only a few tubules will make part of the reproductive system (Sinsawat, 2010; Tiedemann, 2012). At this stage of gestational development, the cat is considered fetus. Fetus is defined as the one who possess specific external characteristics of its species as well as differentiated genitalia (Peei et al., 2015).

In the last stage of development between 50 and 60 gestational days, the fetus has all its characteristics formed and it is only in final growth. The urinary system contains the metanephros divided in cortex and medulla, ureters, urinary bladder and urethra completely formed, as described by Prado et al. (2014) in *Philander opossum*, Cayan and Sack (2010) about domestic animals and Knope (2002) specifically about cats. Microscopically, all the structures were found formed and well determined, which is in accordance with Junqueira and Carneiro

(2012) and Bacha and Bacha (2002). The structures that compose the nephron were completely developed and functional as demonstrated in mammalian by Dresler (2004).

From the cellular level point of view, samples of transmission electron microscopy provides the observation of the glomeruli and contorted tubules components, as well as the main organelles that are present in these structures. Comparing the structures present in the renal capsule of the amphibian, it was found that mesonephros is related to the cat, it could be observed a certain relation with the cell types present in both mesonephros, such as glomerular capillaries, mesangial cells and podocytes. In cats this is a temporary organ, being functional during the embryonic development degenerating during the fetal stage (Knope, 2002), that was confirmed by the presence of lysosome and vacuoles that formed inside the cells. These organelles are responsible for the intracellular digestion (Klein, 2012) characteristic of the degeneration process of the organ.

The definitive kidney in cats is the metanephros that also presents the structures of the renal capsule described in the mesonephros. These cells are very important due to its specific functions in the kidney. Glomeruli capillaries are responsible for blood filtration (Klein, 2012), the mesangial cells are responsible for supporting the glomeruli and podocytes make part of blood filtration process. In the metanephros, the proximal and distal convoluted tubules were also seen, and they differ from one another through the brush border (Sartan & Hussein, 2014) that is present only in the proximal tubules. The tubular region is responsible for producing urine by water and electrolytes reabsorption (Klein, 2012).

Through immunohistochemistry technique, it was possible to evaluate vessels formation from tubules and glomeruli. The metanephros of 22 days positively expresses the protein lectin, present in the glomerular formation. There was expression of pluripotency and cell proliferation markers like CD9, which was positively marked in all structures of the mesonephros, different from the metanephros in which there was no staining for this protein. CD9 is a glycoprotein of the tetraspanin family present in the cell membrane, and that is involved with cellular development, growth and motility (Powter, Koop, Hankley, Critchley, & Berditchevski, 2011). The expression of PCNA is explained in the mesonephros because even after degeneration it will be part of the reproductive system, and it is possible to demonstrate that its cells will acquire different function in another organ that is not of renal origin. On the metanephros, by the other hand, it was observed that the cells are responsible, from beginning to the end, for the same function in the same organ. Nuclear cell proliferation antigen (PCNA) was expressed in all mesonephros and metanephric structures. The PCNA codifies a protein that is found inside the nucleus and is a co-factor of delta-DNA polymerase (Boiffin et al., 2016), and has the function of DNA replication and repairing. All the cells present in metanephros and mesonephros will proliferate either to cellular renovation or their differentiation. Caspase 3 marker was used to prove that at 27 gestational days the mesonephros was in cellular degeneration differently from the other ages. These data are significant to evaluate the renal stages, once in the development the proliferative and cellular differentiation rates gradually decrease.

The embryonic and fetal development of the domestic cat is like other mammalian, emphasizing that the pronephros is found in

embryos from 15 to 19 days, the mesonephros from 17 to 27 days, and the metanephros from 21 gestational days. The urinary organogenesis in felines contributes to specific knowledge about the embryonic development in organs that are more affected by diseases in this species, and gives support for future studies of species in which these embryonic and fetal structures were not described yet.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the FAPESP and CAPES development agencies for the financial support and CAD/FMVZ for technical support.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interests.

ORCID

Francielle D. Oliveira <http://orcid.org/0000-0002-2707-5104>

REFERENCES

- Abipet, Associação brasileira de indústria de produtos para animais de estimação. (2015) População de pets cresce 5% ao ano e Brasil é quarto no ranking mundial. São Paulo. Retrieved from <http://abipet.org.br/abipet/portal-en/populacao-de-pets-cresce-5-ao-ano-e-brasil-e-quarto-no-ranking-mundial/> Accessed October 1, 2018.
- Almeida, J. M. (1999). *Embriologia Veterinária Comparada* (1st ed.). Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.
- Almeida, J. M., Rodrigues, E. A. F., Martins, J. M., Francielli, A. L., Souza, C. C., Robaldo, V. C. S., ... Higino, M. A. (2011). Estudo microscópico e macroscópico, com enfoque radiográfico e de ultrassom, no desenvolvimento embrionário e fetal de gatos domésticos (*Felis catus*) em diferentes idades gestacionais. *Revista Veterinária Brasileira*, 31, 57–66.
- American Humane Association (2012). Animal Welfare Policy and Position Statements. Accessed 10-05-2018. Site: <https://www.americanhumane.org/app/uploads/2016/08/animal-position.pdf>.
- Bacha, W. J., & Bacha, L. M. (2003). Atlas colorido de histologia veterinária (2nd ed.). São Paulo, SP: Roca.
- Leffebvre, S. (2011). Literature review - Epidemiology of feline chronic kidney disease. *Research Applied Research & Knowledge Trans*, 1–11.
- Rjerg, N., Larsen, E. H., & Jørgensen, A. (1998). Morphology of the nephron in the mesonephros of *Rana lessonae* (Anura, Bufonidae). *Acta Zoologica*, 79, 31–50.
- Reifen, E. H., Powers, K. T., Kandrak, C. H., Spier, H., Houston, J. C. D., & Vining, M. T. (2014). The PCNA-interacting protein (PIP) motif of DNA polymerase δ mediates its interaction with the C-terminal domain of Rev1. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 8735–8744.
- Calton, M. (1994). *Embriologia e Biologia do Desenvolvimento*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.
- Costa, M. C. N., Marcollo, G. C. G., Almeida, N. Y., & Ferreira, A. M. R. (2009). Avaliação da relação proteína-creatinina urinária em gatos com doença renal crônica. *Revista Veterinária Brasileira*, 29, 605–609.
- Chew, D. J., DiBartola, S. P., & Schenck, P. A. (2011). *Cat and feline nephrology and urology* (2nd ed.). Saint Louis, MO: Elsevier.
- Drescher, G. R. (2004). Cellular basis of kidney development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 509–529.
- Dyce, K. M., Wensing, C. J. G., Sack, W. O. (2010). *Tatodo de anatomia veterinária*. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier.
- Evans, H. E., & Sack, W. O. (1972). Prenatal development of domestic and laboratory mammals: Growth curves, external features and selected references. *Anatomia Histologia Embryologia*, 3, 11–45.
- Garcia, S. M. L., & Fernández, C. G. (2007). *Embriologia* (2nd ed.). Porto Alegre, RS: Artmed.
- Júnior, A. R., & Hagiwara, M. K. (2004). Semelhanças entre a doença idiopática do trato urinário inferior dos felinos e a cistite intersticial humana. *Ciência Rural*, 34, 215–221.
- Junqueira, L. C. U., & Carneiro, J. (2012). *Histologia Básica* (12th ed.). Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.
- King, J. N., Taylor, S., Gunn-Moore, D., & Strömberg, G. (2007). Prognostic factors in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 904–914.
- Klein, B. G. (2012). *Renal physiology*. In *Cunningham's textbook of veterinary physiology* (5th ed.). Ontario, TO: Elsevier.
- Knaep, C. (2002). Periods and stages of the prenatal development of the domestic cat. *Anatomia Histologia Embryologia*, 31, 37–51.
- Lyons, L. A., Kanachina, J. D. (2012). A short natural history of the cat and its relationship with humans. In: *The cat clinical, medicine and management*. Saint Louis, MO: Elsevier.
- Menezes, L. P., Halber, D., Zanotto, M. S., Sá, L. R. M., Hagiwara, M. K., & Malhada, P. C. (2014). Aspectos histopatológicos das lesões renais em gatos experimentalmente infectados pelo vírus da imunodeficiência felina. *Revista Veterinária Brasileira*, 34, 869–873.
- Moore, K. L., & Persaud, T. V. N. (2008). *Embriologia Básica*. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier.
- Oliveira, M. F., Vale, A. M., Favaron, P. O., Vasconcelos, B. G., de Oliveira, G. B., Higino, M. A., & Moss, A. (2012). Development of yolk sac involution in *Galea spall* and *Cavia porcellus* (Rodentia, Cavidae). *Placenta*, 33, 878–881.
- Pier, N. C. G., Souza, A. F., Casali, J. B., Robaldo, V. C. S., Ambrosio, C. E., & Martins, D. S. (2015). Comparative development of embryonic age by organogenesis in domestic dogs and cats. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 625–631.
- Polin, D. J. (2007). 11 guidelines for conservatively treating chronic kidney disease. *Veterinary Medicine*, 102, 788–799.
- Polin, D. J., Osborne, C. A., & Ross, S. (2010). Chronic kidney disease. In *Textbook of veterinary internal medicine expert consult* (7th ed.). Philadelphia: Elsevier.
- Povner, D., Knap, P. H., Montley, S. J., Grichay, D. R., & Berditchevski, F. (2011). Tetraspanin CD9 in cell migration. *Biochemical Society Transactions*, 39, 563–567.
- Prado, C. V. G. B., Camargo, C. H. O., Santos, A. C. M., Rodrigues, R. F., Favaron, P. O., Rodrigues, M. N., & Higino, M. A. (2014). Arquitetura e estrutura das rês de *Gadomus microstomus* (Diplophorinae: Diplophorinae) (Mammalia, 1842). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 51, 297–300.
- Sakic, K., & Ahtola, A. R. (1999). Mesangial kidney - A stem cell factory? *The International Journal of Developmental Biology*, 43, 425–433.
- Sahar, O. M. M., & Hussein, A. R. M. (2014). Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1505–1517.
- Senra, M. C. (2014). O BGE e a história das Reconhecimentos Agrupamentos. Rio de Janeiro, RJ: Pineda Brasil.
- Stewart, F. (2010). Development of the urinary tract. In: *Essentials of domestic animal embryology* (1st ed.). Ontario, TO: Elsevier.
- Tiedemann, K. (2012). *The mesonephros of cat and sheep: Comparative morphological and histochemical studies*. Berlin: Springer.
- Talata, E. H. C., Rodrigues, C. J., Behmer, O. A., & Horta, A. G. F. (2002). *Manual de técnicas para histologia normal e patológica* (2nd ed.). São Paulo, SP: Manole.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Moraes LC, Morais MP, Barghest J, et al. Development of urinary organs in domestic cat during the embryonic and fetal periods. *Microsc Res Tech*. 2018;1–9. <https://doi.org/10.1002/jemt.23135>