UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

INGRID DA SILVA GOMES

**Teste pré-clínico em doença renal crônica canina, com o uso de células-tronco
amnióticas**

Pirassununga

2017

INGRID DA SILVA GOMES

**Teste pré-clínico em doença renal crônica canina, com o uso de células-tronco
amnióticas**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Ciências

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

Pirassununga

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

da Silva Gomes, Ingrid
dG633t Teste pré-clínico em doença renal crônica canina,
com o uso de células-tronco amnióticas / Ingrid da
Silva Gomes ; orientador Carlos Eduardo Ambrósio. --
Pirassununga, 2017.
59 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Âmnio. 2. Células-Tronco. 3. DRC. 4. Terapia
Gênica. I. Ambrósio, Carlos Eduardo, orient. II.
Título.

Janu

Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Aluno: 74135 - 8901628 - 1 / Página 1 de

Ata de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Ingrid da Silva Gomes no Programa: Biociência Animal, do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Aos 18 dias do mês de dezembro de 2017, no(a) Sala de aula do UDCH realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Ingrid da Silva Gomes, apresentada para a obtenção do título de Mestra intitulada:

"Teste pré-clínico em doença renal crônica canina, com o uso de células-tronco amnióticas"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Carlos Eduardo Ambrosio	Presidente	FZEA - USP	Não Votante
Deise Carla Almeida Leite Dellova	Titular	FZEA - USP	<u>APROVADA</u>
Leandro Zuccolotto Crivellenti	Titular	UNIFRAN - Externo	<u>APROVADA</u>
Celina Almeida Furlanetto Mançaneres	Suplente	UNIFEOB - Externo	<u>APROVADA</u>

Resultado Final: APROVADA

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Maria Cecília Albernaz Lins Silva, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Pirassununga, aos 18 dias do mês de dezembro de 2017.

Deise Carla Almeida Leite Dellova
Deise Carla Almeida Leite Dellova

Leandro Zuccolotto Crivellenti
Leandro Zuccolotto Crivellenti

Celina Almeida Furlanetto Mançaneres
Celina Almeida Furlanetto Mançaneres

Carlos Eduardo Ambrosio
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 19.12.2017 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestra em Ciências obtido no Programa Biociência Animal.

Profª. Drª. Rosemary Aparecida de Carvalho
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Profª. Drª. Rosemary Aparecida de Carvalho
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FZEA/USP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Izabel Domingos** e **Luiz Gomes** e aos meus irmãos **Wesley** e **Elwyn**, pela paciência, incentivo e apoio: eu os dedico.

AGRADECIMENTOS

Como citou Eduardo Sampaio: Uma pessoa sem fé é uma pessoa sem chama, não ilumina nada ao seu redor e nem a si mesma. Sendo eu uma pessoa de muita fé, gostaria de agradecer primeiramente a Deus, senhor soberano que nos concede a vida para que possamos aproveitar todas as oportunidades.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Ambrosio (Caju), por acreditar na minha capacidade e depositar sua confiança, me concedendo a oportunidade de desenvolver o projeto junto ao seu grupo de estudo.

À veterinária MCT Danielle Passarelli, Professora Dra Cristina Hage, M.V. Dra Juliana Casals e a todos os colegas veterinários que me ajudaram no desenvolvimento desse estudo.

Aos amigos e amigas do GDTI, Jessica, Alessandra, Kelly, Valéria, Luciana, Cury, Lina, Rafael, Vanessa, Natalia, Vitória, Dani, Aline, pela paciência e auxílio em todas as horas que me vi perdida e precisei de ajuda, além das conversas que tornaram os dias em Pirassununga mais leves.

Às minhas amigas- irmãs da: Carol, Thaís, Gabi e Lores, pela amizade e companheirismo. Vocês se tornaram essenciais na minha vida.

Aos amigos que fiz em São João da Boa Vista, em especial: Professora Dra. PriCTila Balieiro, Camila, Gibi, Elis, Bouvet, Karina e Gislaine, já são quase dois anos de saudades e mesmo assim nossa amizade nunca mudou.

Aos amigos de Aguaí, em especial Zezinha, Zé (*in memorian*), Ramon e Edvaldo, sempre me apoiaram e estiveram do meu lado nas minhas decisões.

À Marlon, Dianne, Pedro Ricardo, Isaac e em especial a Jader, pela paciência, incentivo e por torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus tios Edmarcos, Maria, Manu e Toninho e primos Arnon, Diogo, Malu e Letícia por me acolherem durante todo esse período e por fazer eu me sentir em casa, suprimindo um pouco da saudade do meu lar.

“O grau mais elevado da sabedoria humana é saber adaptar o seu carácter às circunstâncias e ficar interiormente calmo apesar das tempestades exteriores”.

Daniel Defoe

RESUMO

GOMES, I. S. **Teste pré-clínico em doença renal crônica canina, com o uso de células-tronco amnióticas.** 2017. 59p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

A doença renal crônica (DRC) é uma afecção frequente em cães idosos, de alta morbidade e mortalidade, sendo definida como uma injúria renal morfo-funcional irreversível, de um ou ambos os rins, que está intrinsecamente associada à degeneração celular. Seu tratamento é paliativo, sendo que nos estágios mais avançados, o animal pode necessitar de hemodiálise ou transplante renal, prática dificultada e muitas vezes inviável na medicina veterinária. As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido amniótico caracterizam-se por ser uma população de células de alta plasticidade e de grande potencial imunomodulador, sendo capazes de se diferenciar e produzir diferentes tipos celulares necessários num processo de reparação. Os avanços nos estudos das células-tronco podem tornar a terapia celular uma forma viável de tratamento alternativo ou adjuvante dessa doença, uma vez que estas poderiam restaurar a funcionalidade e manter a integridade do rim. O objetivo deste estudo foi avaliar se o tratamento experimental com células-tronco mesenquimais derivadas do âmnio (CTMAs) canino podem reduzir ou estabilizar a taxa de progressão e o quadro clínico da DRC em cães. Para tanto, células-tronco provenientes da membrana amniótica foram cultivadas até a segunda passagem (P2) e criopreservadas para posterior aplicação. Onze cães domésticos, machos e/ou fêmeas, acometidos pela DRC adquirida em graus II ou III segundo classificação da IRIS e sem outra afecção adjacente receberam duas aplicações de CTMAs nos dias D0 e D30, por via endovenosa. Para avaliar a progressão ou estabilização do quadro clínico foram colhidas amostras de sangue total, soro sanguíneo e urina para exames de hemograma, bioquímica sérica e urinária e urinálise em quatro momentos: D0, D7, D30 e D60. A análise estatística foi realizada através da aplicação do teste ANOVA, para comparação de médias nas diferentes fases de tratamento, seguida pelo teste de *Tukey*, para comparação das médias entre os grupos. Do ponto de vista clínico, dois animais apresentaram melhora e se mantiveram estáveis durante todo o período de acompanhamento, dois animais apresentaram melhora nos primeiros 30 dias, apresentando novamente sintomatologia da doença após esse período e os demais apresentaram melhora nos primeiros sete dias de tratamento, havendo uma piora geral do quadro após esse período. Contudo, os exames laboratoriais em todos os casos não revelaram uma melhora significativa com o tratamento. Aparentemente, a utilização de células-tronco de origem amniótica não influencia de forma relevante na melhora da doença devido à extensa lesão renal que cães apresentam.

Palavras-chave: âmnio, célula-tronco, DRC, terapia gênica

ABSTRACT

GOMES, I. S. **Preclinical test in canine chronic kidney disease in the use of amniotic stem cells.** 2017. 59f. M.S.c. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Chronic kidney disease (CKD) is a common condition in older dogs with high morbidity and mortality and is defined as an irreversible morpho-functional renal injury of one or both kidneys, which is intrinsically associated with cell degeneration. Its treatment is palliative, and in the more advanced stages, the animal may need dialysis or kidney transplantation, a practice that is difficult and often not feasible in veterinary medicine. The mesenchymal stem cells derived from amniotic tissue characterized by being a population of high plasticity and high cell immunomodulatory potential, being able to differentiate and produce different cell types required in a repair process. Advances in stem cell studies may make cell therapy a viable alternative or adjunctive treatment for this disease, since it could restore functionality and maintain kidney integrity. The objective of this study was to evaluate if the experimental treatment with the canine amnio- derived mesenchymal stem cells (AMSCs) can reduce or stabilize the rate of progression, and clinical condition of CKD in dogs. For this purpose, stem cells from the amniotic membrane were grown until the second pass (P2) and cryopreserved for later use. Eleven domestic male and / or female dogs, affected by the CKD acquired in grades II or III according to IRIS classification and without another adjacent disease, received two applications on days D0 and D30 intravenously. To evaluate the progression or stabilization of the clinical condition, whole blood, blood serum and urine samples were collected for hemogram, serum and urinary biochemistry and urinalysis at four moments: D0, D7, D30 and D60. Statistical analysis was performed using the ANOVA test, to compare means in the different treatment phases, followed by the Tukey test, to compare the means between the groups. From a clinical point of view, two animals showed improvement and remained stable throughout the follow-up period, two animals showed improvement in the first 30 days, showing again symptoms of the disease after this period and the other showed improvement in the first seven days of treatment, with a general worsening of the condition after this period. However, laboratory tests in all cases showed no significant improvement with treatment. Apparently, the use of stem cells of amniotic origin does not influence in a relevant way the improvement of the pathology due the extensive kidney lesion presented by dogs.

Keywords: amnion, stem cell, CKD, gene therapy

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Estadiamento da DRC segundo a <i>International Renal Interest Society</i> (IRIS)	19
Tabela 2 Subestadiamento da DRC de acordo com a presença de proteinúria	20
Tabela 3 Subestadiamento da DRC de acordo com a Pressão Sanguínea Sistólica	20
Tabela 4 Descrição resumida dos cães incluídos neste estudo	28
Tabela 5 Médias ($\pm$ erros padrão) do peso dos animais nas diferentes fases de acompanhamento clínico dos cães com DRC com as CTMAs.	35
Tabela 6 Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros de hemograma e leucograma dos animais nas diferentes fases de acompanhamento clínico dos cães com DRC com as CTMAs.	36
Tabela 7 Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros de bioquímica sérica dos animais nas diferentes fases de acompanhamento clínico dos cães com DRC com as CTMAs.....	37
Tabela 8 Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros de urinálise e do <i>clearence</i> de creatinina dos animais nas diferentes fases de acompanhamento clínico dos cães com DRC com as CTMAs.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Desenho experimental para aplicação da terapia celular em cães acometidos com DR.....	31
Figura 2. Isolamento e cultivo das células-tronco proveniente do tecido amniótico.	34
Figura 3. Imagens ultrassonográficas da arquitetura e morfologia renal dos 11 cães domésticos utilizados neste estudo.	39

LISTA DE SIGLAS

CT	Células-tronco
CTA	Células-tronco adultas
CTE	Células-tronco embrionárias
CTM	Células-tronco mesenquimal
CTMA	Células-tronco mesenquimal amnióticas
CTM-MO	Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea
DRC	Doença Renal Crônica
IRA	Insuficiência Renal Aguda
IRC	Insuficiência Renal Crônica
IRIS	<i>International Renal Interest Society</i>
NGAL	Lipocalina associada à neutrófilo gelatinase
TFG	Taxa de filtração glomerular
UPC	Relação proteína/ creatinina urinária

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. MORFOFISIOLOGIA RENAL.....	16
2.2. DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC).....	17
2.2.1. Causas e prevalência da DRC.....	17
2.2.2. Fisiopatologia da DRC.....	17
2.2.3. Abordagem clínica e laboratorial da DRC.....	18
2.2.4. Classificação da DRC	19
2.2.5. Abordagem terapêutica da DRC	21
2.3. TERAPIA CELULAR	21
3. HIPÓTESE.....	24
4. OBJETIVOS	25
4.1. GERAL	25
4.2. ESPECÍFICOS.....	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1. ESTABELECIMENTO DO CULTIVO CELULAR E CRIOPRESERVAÇÃO	26
5.2. ENSAIO PRÉ- CLÍNICO	27
5.2.1. Animais de estudo.....	27
5.2.2. Manejo dos animais	29
5.2.3. Descongelamento Celular.....	30
5.2.4. Transplante de CTMAs.....	30
5.2.5. Exames hematológicos	31
5.2.6. Bioquímica sérica	31

5.2.7. Urinálise.....	32
5.2.8. Bioquímica Urinária	32
5.2.9. <i>Clearence</i> de creatinina	32
5.3. ULTRASSONOGRAFIA	33
5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
6. RESULTADOS.....	34
6.1. ISOLAMENTO DE CTMA _s CANINO.....	34
6.2. INJEÇÃO ENDOVENOSA DE CTMA.....	35
6.3. AVALIAÇÃO LABORATORIAL.....	36
6.4. ULTRASSONOGRAFIA	38
7. DISCUSSÃO	40
8. CONCLUSÃO	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	51

1. INTRODUÇÃO

As doenças renais são consideradas um importante problema de saúde pública, uma vez que causam grande morbidade e mortalidade em pacientes humanos, pois costumam ser diagnosticadas tardiamente (BELLOMO et al. 2001). As doenças do rim e do trato urinário são responsáveis por aproximadamente 850 milhões de mortes anuais em humanos, e a incidência da doença renal crônica em cães é em torno de 1,5% na população em geral (SZUSTER et al. 2009; POLZIN, 2011).

A insuficiência renal ocorre quando aproximadamente 75% dos néfrons de ambos os rins não funcionam adequadamente (GRAUER, 2001), podendo ocorrer na forma aguda (IRA) ou na crônica (IRC). A progressão do quadro clínico, juntamente com a dificuldade terapêutica de se estabilizar o paciente canino e a inviabilidade financeira de se realizar uma hemodiálise com a frequência necessária ou transplante renal, tornam necessários estudos de novas terapias que visem melhorar a qualidade de vida do paciente.

A terapia celular é alvo de importantes estudos, os quais buscam, principalmente, a reversão de quadros celulares degenerativos, uma vez que as células-tronco (CTs) são definidas funcionalmente como células que possuem capacidade de regeneração ilimitada e potencial de diferenciação, o que lhes confere um papel primordial e vital durante o processo de desenvolvimento ao longo da vida (ASAHARA, 2004; MIMEAULT, 2006).

Estudos indicam que as células-tronco de origem fetal se mostram uma fonte celular bastante promissora, uma vez que são obtidas facilmente a partir de tecidos extra-embrionários através do saco vitelínico, âmnio e córion (FUKUCHI et al. 2004; PAROLINI; CARUSO, 2011; WENCESLAU et al. 2011; URANIO et al. 2011).

O âmnio é uma fonte potencial de células multipotentes que pode ser usado sem levantar questões éticas, uma vez que é um tecido normalmente descartado, além de permitir o isolamento das células-tronco mesenquimais (CTMs) com alta eficiência sem necessidade de procedimentos invasivos (HUO et al. 2010; FERNANDES et al. 2012; INSAUSTI et al. 2014).

Vidane et al. (2017) comprovaram que a terapia com CTMAs (Células Tronco Mesenquimais Amnióticas) em felinos diagnosticados com DRC atuou como renoprotetor e melhorou a função renal, indicando assim que o seu uso pode ser uma ferramenta promissora para o bem estar desta espécie.

Este estudo pretendeu estabelecer um modelo pré-clínico para avaliar o tratamento experimental com células-tronco mesenquimais, derivadas da membrana amniótica canina, para a DRC em cães domésticos. Desta forma, aprofundando o conhecimento da resposta clínica e sistêmica proporcionada pela terapia neste modelo animal, para posterior aplicação na clínica veterinária, além de servir de modelo para um estudo no modelo humano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MORFOFISIOLOGIA RENAL

Os rins são estruturas pares, de coloração pardoavermelhados, apresentando nos cães domésticos superfície lisa, com uma única papila renal, o que os define como unilobados, e em formato de feijão. Estão situados retro-peritonealmente comprimidos contra a parede abdominal dorsal, dos dois lados da coluna vertebral (KONIG; LIEBECH, 2011).

O parênquima renal é envolvido por uma cápsula fibrosa resistente, a qual o adentra no aspecto medial do rim para revestir as paredes do seio renal, sendo dividido em córtex renal, que possui coloração pardoavermelhado e aparência granular, e em medula renal, composta de uma zona externa escura e uma zona interna mais pálida, a qual possui estrias radiais e se projeta até o seio renal (KONIG; LIEBECH, 2011).

O rim possui diversos papéis na manutenção da homeostase, que são desempenhadas pelo néfron, que é a sua unidade funcional. Esse é formado por diferentes estruturas que tem a função de filtração, reabsorção, secreção e ajuste na concentração final da urina. Cada néfron possui um glomérulo, túbulo proximal, alça de Henle, tubo distal e túbulo coletor. (CUNNIGHAN; KLEIN, 2008; HALL, 2017).

A função principal do rim é manter a composição dos líquidos corporais dentro do âmbito fisiológico. Ele remove dejetos metabólicos e excreta substâncias do sangue pela filtração do plasma, este processo ocorre no glomérulo, que consiste em uma rede de capilares. Como resultado da filtração glomerular há a formação de ultrafiltrado no espaço de Bowman e uma pequena quantidade de albumina é filtrada. A reabsorção do filtrado ocorre no túbulo proximal com reabsorção de compostos catiônicos e aniônicos. A alça de Henle concentra a urina e em seguida, dilui o filtrado através de reabsorção seletiva de água e de sódio. O túbulo contorcido distal e os ductos coletores reabsorvem solutos, determinam o pH e a concentração final da urina (CUNNINGHAM; KLEIN, 2008; KONIG; LIEBECH, 2011; BARTGES, 2012; HALL, 2017).

Os rins também respondem a distúrbios hídricos, eletrolíticos e estão envolvidos na regulação do equilíbrio ácido-básico, alterando especificamente a taxa de reabsorção ou secreção de ácidos e bases, além de possuírem funções endócrinas, por meio do sistema

renina-angiotensina-altosterona onde a enzima renina, que converte a proteína plasmática angiotensinogênio em angiotensina I. Na circulação, a enzima de conversão transforma angiotensina I em angiotensina II, ao qual causa constrição arterial, aumentando a pressão sanguínea. A bradicinina é um hormônio produzido pelos rins, o qual causa dilatação dos vasos sanguíneos e a eritropoetina, também produzida pelos rins, intensifica a eritopoese (KONIG; LIEBECH, 2011; BARTGES, 2012).

2.2. DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

A doença renal é definida como a disfunção da função renal, de maneira súbita, provocando acúmulo de substâncias nitrogenadas na corrente sanguínea, como ureia e creatinina (COSTA et al. 2003). Quando a injúria renal está presente há três meses ou mais, apresentando perda da função de filtração glomerular e lesões renais irreversíveis, define-se o quadro como DRC (POLZIN, 2011). A diminuição da função renal leva ao acúmulo de substâncias que deveriam ser excretadas do organismo e compromete a capacidade funcional de outros órgãos, resultando em azotemia (RUFATO et al. 2011).

2.2.1. Causas e prevalência da DRC

A prevalência de DRC em cães varia entre 0,05-3,74%, e os fatores de risco identificados incluem: idade avançada, raças específicas e tamanho corporal pequeno (O'NEILL et al. 2013).

A maior incidência da doença ocorre em cães idosos, com idade média de 7 anos (NOTOMI et al. 2006). A DRC pode ter origem congênita/familiar, assim como a hipoplasia e a displasia renal, ou adquirida através de injúrias progressivas e crônicas decorrentes de medicações, anestésias, intoxicações, infecções e hemorragias (RUBIN, 1997).

2.2.2. Fisiopatologia da DRC

Uma vez que os rins estão envolvidos com toda a homeostase corporal, a DRC está associada a muitos distúrbios metabólicos que, em geral, afetam o bem estar animal. Portanto, quando a função renal diminui, existe perturbação da homeostase, resultando em retenção de compostos que deveriam ser excretados, como o fósforo e ácidos metabólicos tóxicos, e perda de compostos que devem ser conservados, como a água e as proteínas (BARTGES, 2012).

A azotemia é uma anormalidade bioquímica que se refere a uma elevação dos níveis de ureia e da creatinina, e está amplamente relacionada com uma taxa de filtração glomerular diminuída. Quando a azotemia se torna associada a vários sinais e sintomas clínicos além de anormalidades bioquímicas, é chamada de uremia. A uremia é caracterizada pela falência da função excretora renal e por um grande número de alterações metabólicas e endócrinas que resultam em danos renais. Os pacientes urêmicos frequentemente manifestam um envolvimento secundário do sistema gastrointestinal (ex. gastroenterite urêmica), de nervos periféricos (ex. neuropatia periférica) e do coração (ex. pericardite fibrinosa urêmica) (BARTGES, 2012; APERS et al. 2016).

2.2.3. Abordagem clínica e laboratorial da DRC

O diagnóstico de DRC, em geral, se baseia na combinação de anamnese, exames físicos, ultrassonografia abdominal e raio-x, e exames clínico-laboratoriais, aos quais destacam-se a dosagem sérica de ureia e creatinina, depuração da creatinina plasmática (*clearance* de creatinina), quantificação de cistatina C e ausência de elementos anormais do sedimento urinário (GRAUER, 2001; MOTTA, 2003; QUIRINO; CALDAS, 2006; WARE, 2006; ABENSUR, 2011).

Rotineiramente a disfunção renal e a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) são diagnosticadas unicamente pelas alterações nas concentrações de creatinina sérica e uréia no sangue, no entanto, nenhum destes testes é sensível ou específico o suficiente para o diagnóstico precoce da função renal comprometida (DE LOOR et al. 2013).

Clinicamente, a IRC em cães é tipicamente detectada pela presença de azotemia, proteinúria renal persistente, ou ambos, associados à baixa capacidade da concentração urinária e aparência anormal dos rins no exame de ultrassonografia. A proteinúria renal persistente, tipicamente quantificada na relação proteína/ creatinina urinária (UPC) pode ser um indicador da doença em cães (LEES, 2004).

Alguns sintomas da uremia incluem: perda de massa muscular, perda de peso (devido à anorexia/hiporexia), polidipsia e poliúria (decorrentes da incapacidade dos rins de regular o balanço hídrico), vômitos, halitose e estomatite ulcerativa (GRAUER, 2001; SENIOR,

2001; ELLIOTT; LEFEBVRE, 2009; BARTGES, 2012). Entretanto, alguns cães, nos estádios iniciais da DRC, podem apresentar-se assintomáticos (RUBIN, 1997).

Rins com DRC à palpação apresentam-se pequenos e irregulares, o que pode ser confirmado com ultrassonografia abdominal. Bioquimicamente, azotemia com urina inapropriadamente diluída, acidose metabólica e hiperfosfatemia estão presentes. Adicionalmente, alguns pacientes possuem hipocalemia, anemia não regenerativa, hipoalbuminemia e infecção bacteriana do trato urinário (BARTGES, 2012).

2.2.4. Classificação da DRC

A *International Renal Interest Society* (IRIS, 2016) classifica a DRC em quatro estádios de acordo com a concentração dos níveis séricos de creatinina (tabela 1) e subestadia pela presença de proteinúria (tabela 2) e de acordo com a pressão arterial sanguínea (tabela 3). Os estádios vão de I, onde os animais não apresentam azotemia, podendo ser diagnosticado em cães com proteinúria persistente e deficiência na concentração de urina, até o IV (creatinina sérica > 5,0 g/dL) caracterizado pela azotemia severa, e reflete no estágio terminal da DRC.

Tabela 1 Estadiamento da DRC segundo a *International Renal Interest Society* (IRIS)

Estádio	Creatinina plasmática (g/dL)	Comentário
I	<1,4	Não azotêmico; Inabilidade de concentrar urina e alterações que podem ser percebidas aos exames de imagem e biopsia
II	1,4- 2,0	Discreta azotemia em avaliações seriadas
III	2,1-5,0	Azotemia moderada; Pode haver presença de sinais clínicos de alguns sistemas
IV	>5,0	Azotemia severa; Presença de sinais clínicos extrarrenais.

Fonte: IRIS (2016)

Tabela 2 Subestadiamento da DRC de acordo com a presença de proteinúria

Valores de UPC	Subestadiamento
<0.2	Não proteinúrico
0.2- 0.5	Limite da proteinúria
>0.5	Proteinúrico

Fonte: IRIS (2016)

Tabela 3 Subestadiamento da DRC de acordo com a Pressão Sanguínea Sistólica

Pressão Sanguínea Sistólica mm Hg	Subestadiamento da Pressão sanguínea	Risco futuro de dano em órgãos
<150	Pressão Arterial Normal	Mínimo
150-159	Limite da hipertensão	Baixo
160-179	Hipertensão	Moderado
≥180	Hipertensão severa	Alto

Fonte: IRIS (2016)

Recentemente a *International Renal Interest Society* (2016) baseada em estudos preliminares do uso inicial, propôs as Diretrizes simétricas de dimetilarginina (SDMA) para classificação da DRC uma vez que esta pode ser um biomarcador mais sensível da doença.

Segundo a IRIS (2016), um aumento persistente da SDMA acima de 14 µg / dl sugere redução da função renal e pode ser uma razão para considerar um cão com valores de creatinina <1,4 como estágio I da DRC. No estágio II, pacientes com escore corporal baixo, SDMA ≥25 µg / dl pode indicar que o grau de disfunção renal foi subestimado, devendo-se considerar as recomendações de tratamento para estágio III neste paciente. No estágio III,

pacientes com escore corporal baixo e SDMA ≥ 45 $\mu\text{g} / \text{dl}$ pode-se indicar tratamento e recomendações do estágio VI da DRC para este paciente.

2.2.5. Abordagem terapêutica da DRC

O tratamento clínico da DRC consiste de uma terapêutica auxiliar e sintomática, cujos objetivos visam à correção de desequilíbrios e desaceleração da característica progressiva da doença. Dentre as alterações a serem ajustadas tem-se a nutricional, eletrolítica, ácido-básica, proteinúria, hidratação, retenção de resíduos, neuroendócrino e hipertensão (BARTGES, 2012).

A terapia nutricional é um ponto chave na gestão de cães com DRC e inclui reduções na ingestão de proteína, fósforo e sódio, além de modificações na ingestão de cálcio e potássio quando necessário e aprimoramento na ingestão de água, vitaminas solúveis em água, ácidos graxos e ômega-3 (LARSEN et al. 2012).

Todos os tratamentos para a doença renal crônica precisam ser individualizados para cada paciente e adaptados de acordo com a resposta, tendo como ponto de partida o recomendado para a maioria dos cães em cada estágio (*International Renal Interest Society*, 2016).

2.3. TERAPIA CELULAR

Em relação à origem há duas importantes classes de células-tronco, as células-tronco embrionárias (CTEs), que estão presentes na massa celular interna do embrião e podem dar origem a três camadas germinativas embrionárias (endoderme, mesoderme e ectoderme) e as células-tronco adultas (CTAs), que são responsáveis pela manutenção dos tecidos normais (BOIANI & SCOLER, 2005). Comparadas às CTEs, as CTAs são consideradas altamente multipotentes e são capazes de produzir todos os tipos celulares específicos dos folhetos embrionários a qual são derivadas (GATTEGNO-HO et al. 2012).

Dentre as linhagens de CTAs estudadas, as células-tronco mesenquimais (CTMs) são células somáticas adultas derivadas de vários tecidos adultos e fetais que possuem morfologia fibroblásticoide, alta capacidade de expansão *in vitro* e alta plasticidade. Esta população de células tem a capacidade de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num

processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras (PITTENGER et al. 1999; ABDULRAZZAK et al. 2010).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu três critérios mínimos para definir uma célula-tronco como mesenquimal: a aderência ao plástico de cultura, expressão dos antígenos (Ag) de superfície específicos CD105, CD73 e CD90, além de ausência da expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA classe II, por fim que possuam potencial de diferenciação em alguns tipos celulares *in vitro*, o que as caracterizam como células multipotentes (DOMINICI et al. 2006).

As CTMs têm sido propostas como uma nova opção de tratamento para a DRC por exercer potenciais efeitos anti-inflamatório, além de produzir fatores de crescimento e citocinas. Portanto, indiretamente, melhora a função renal pela redução da fibrose e da inflamação intra-renal associada à doença por meio de secreção de moléculas bioativas com ação parácrina (TOGEL et al. 2007; MCTAGGART et al. 2009; LEE et al. 2010; BIANCHI et al. 2014).

Em modelo animal demonstrou-se a capacidade das CTMs em restaurar a função renal após lesão renal induzida. Após a inoculação, as CTMs por meio de quimiotaxia, vão ao tecido lesado e liberam fatores solúveis e microvesículas que promovem a sobrevivência celular e reparação de tecidos (BIANCHI et al. 2014).

Lim et al. (2016) realizaram um estudo com células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea em cães com insuficiência renal aguda induzida, ao qual apesar de não observarem melhora clínica com a terapia celular, observaram histologicamente retardo na progressão da fibrose intra-renal, comparado ao grupo não tratado.

Semedo et al. (2009) utilizaram ratos *Wister* como modelo para DRC, e utilizando células mesenquimais como terapia observaram que houve modulação da resposta inflamatória que se segue à fase inicial da patologia. Além disso, atribuíram as propriedades imunomoduladoras e de alta plasticidade das CTMs à diminuição da fibrose renal.

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido amniótico (CTMAs) apresentam morfologia celular semelhante a fibroblastos e possuem capacidade de se aderir ao plástico de

cultura, sendo assim indistinguíveis das derivadas da medula óssea (CTM-MO), sendo que as CTMAs podem ser facilmente obtidas em grande quantidade por um método menos invasivo que as CTM-MO, sem esbarrar em questões éticas e políticas (URANIO et al. 2011; PARK et al. 2012; MEESUK et al. 2016).

Uranio et al. (2011) demonstraram em seu estudo que o tempo de duplicação da população de CTMAs aumenta significativamente com o número de passagens, e que não há alteração da viabilidade celular com as passagens.

As células em questão já foram caracterizadas pelo Grupo de Desenvolvimento e Terapias Inovadoras no Laboratório de Células-Tronco, localizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo- Campus Pirassununga –SP, como sendo células-tronco nas espécies caninas e felinas, além de haver segurança para aplicação (CARDOSO et al. 2016; VIDANE et al. 2014).

Del Carlo et al. (2008) explicam que as CTMAs podem ser transplantadas para o local da lesão já diferenciadas, em meio de cultura apropriado, ou na forma indiferenciada, uma vez que através do estímulo do meio ocorre a diferenciação para células especializadas do tecido.

3. HIPÓTESE

As células-tronco atuarão na melhora da filtração glomerular e na manutenção da estrutura renal, conseqüentemente haverá aumento da expectativa e da qualidade de vida de cães com DRC.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

O objetivo do experimento foi avaliar os efeitos do tratamento experimental com células-tronco mesenquimais de âmnio canino em cães diagnosticados com DRC.

4.2. ESPECÍFICOS

- Isolar células-tronco mesenquimais de âmnio canino;
- Tratar experimentalmente cães com DRC com células-tronco mesenquimais de âmnio canino;
- Monitorar a progressão do quadro clínico após o tratamento experimental com células-tronco de âmnio canino, através da avaliação de parâmetros hematológicos, bioquímicos da função renal e urinário e avaliação da filtração glomerular.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O material coletado para obtenção das células-tronco foi proveniente de placenta canina oriundas de campanhas de castração, e a coleta foi realizada de acordo com os princípios adotados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), sob aprovação do Comitê de Ética Animal sob protocolo CEUA nº 5162210916. O experimento foi conduzido em onze cães e sua execução consistiu das etapas descritas a seguir:

5.1. ESTABELECIMENTO DO CULTIVO CELULAR E CRIOPRESERVAÇÃO

O protocolo seguido foi descrito previamente por Vidane et al., (2014), com pequenas modificações. Em resumo, foram utilizados fetos caninos de idade gestacional entre 30 a 45 dias, provenientes de úteros gravídicos obtidos de castrações realizadas na Unidade Didática Hospitalar do Departamento de Medicina Veterinária (UDCH), FZEA-USP e de clínicas particulares localizadas na microrregião de Pirassununga, SP. Após a coleta, o âmnio canino foi lavado com solução tampão PBS, contendo 5% penicilina/estreptomicina (Gibco®) para remoção de muco, coágulos, contaminantes e debris. Sem realizar maceração mecânica, a membrana inteira foi submetida à digestão pela enzima colagenase 0,1% por no máximo três horas a 38,5°C. Após essa etapa, o material foi centrifugado por 5 minutos a 200 x g, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensionado em 1 mL de meio de cultivo DMEM HIGH GLUCOSE (LGC Biotecnologia), acrescido com 10% SFB (Soro fetal bovino estéril. LCG Biotecnologia.), 1% de solução de penicilina/estreptomicina e 1% de L-Glutamina (Gibco®). Na etapa seguinte, o conteúdo foi coado em filtros de malhas estéreis (28 mm, CORNING®) e cultivado em garrafas a 38,5°C numa atmosfera de 5% de CO₂.

Quando as células atingiram crescimento de 80% na placa, todo o meio foi retirado, acrescido de tripsina (Tryple Express: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 0,25% e incubado por 3 minutos a 38,5°C. Após completa degradação enzimática das células aderentes, o conteúdo da placa foi transferido para um tubo tipo falcon e centrifugado durante 5 minutos a 200 G. O pellet resultante foi ressuspensionado em 1 mL de DMEM HIGH GLUCOSE para contagem celular. Em seguida, o conteúdo foi transferido para uma garrafa e cultivado sob as mesmas condições supracitadas. O cultivo celular foi propagado até a segunda passagem (P2) e em todas as passagens, as células foram criopreservadas.

Após desagregação enzimática do cultivo com tripsina a 0,25% e centrifugação, como descrito anteriormente, o pellet resultante foi ressuspenso no meio de congelamento composto por DMEM High glucose, suplementado com 10% de SFB (v/v), 1% penicilina/estreptomicina e dimetil sulfoxido (DMSO). Após determinação da densidade celular, os criotubos foram mantidos *overnight* em um dispositivo próprio para congelamento celular (Mr. Frosty- Freezing Container. Thermo CTientific™) à - 80°C. Após esse período, foram transferidos para o tanque com nitrogênio líquido no qual permaneceram armazenados para utilização posterior.

5.2. ENSAIO PRÉ- CLÍNICO

5.2.1. Animais de estudo

Para inclusão dos animais neste estudo, o projeto foi divulgado em clínicas particulares e hospitais da microrregião de Pirassununga através de panfletos (anexo... panfleto) e rede social online, com explicações claras e objetivas sobre o experimento para obtenção livre de pacientes acometidos pela DRC.

O experimento foi conduzido em 11 (onze) cães domésticos, machos e/ou fêmeas, sem idade e raça definida acometidos por DRC adquirida, de qualquer etiologia exceto litíases, nos estádios II ou III segundo classificação da IRIS (*International Renal Interest Society*, 2016), que foram identificados, de acordo com a manifestação clínica e exames de função renal, coletados com os animais hidratados (Tabela 1). Todos os animais selecionados já eram diagnosticados com a doença há pelo menos 3 meses e os animais acometidos por outras doenças como cardiopatias, hepatopatias, dermatopatias e endocrinopatia foram excluídos da seleção. A descrição resumida dos cães incluídos neste projeto está na Tabela 4.

Durante a realização do experimento, os animais foram mantidos com os seus proprietários e em datas pré-determinadas foram realizadas visitas para acompanhamento. A maioria dos animais foram atendidos na Unidade Didática Clínico-Hospitalar, do departamento de Medicina Veterinária, FZEA-USP, e em alguns casos mediante dificuldade de deslocamento do proprietário, o atendimento foi realizado a domicílio. Nesses momentos, foram realizados anamnese, exame físico e coleta de sangue e urina para execução dos exames laboratoriais.

Todos os cães foram submetidos à anamnese e ao exame clínico geral com o mesmo médico veterinário. A confirmação da DRC foi baseada no histórico e nos achados clínicos, de imagem e laboratoriais.

No primeiro momento (D0) e após 60 dias (D60), os cães foram submetidos a ultrassonografia abdominal, que foi realizada no setor de diagnóstico por imagens do UDCH-FZEA/USP, com o intuito de determinar o grau de lesão renal e realizar comparação morfológica antes e após o tratamento. Todos os exames hematológicos, bioquímicos e de urina, foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do UDCH– FZEA/USP.

Tabela 4. Descrição resumida dos cães incluídos neste estudo

Cão	Descrição	U/ C Sanguínea (mg/dl)	Estadiamento IRIS	Tempo de diagnóstico	Alimenta- ção	Tratamento inicial
1	8 anos MC	U 201,5 C 4,37	III	1 ano	CC	Fluidoterapia, eritropoetina
2	11 anos FI	U 61,7 C 2,03	III	3 anos	RR	Fluidoterapia
3	2 anos FI	U 91,8 C 1,64	II	1 ano	RR	Fluidoterapia, quelante de fósforo
4	8 anos MI	U 106,8 C 2,05	II	1 ano e 1 mês	RR e CC	Fluidoterapia, enalapril, eritropoetina
5	10 anos FC	U 70,2 C 1,57	II	5 meses	R	Fluidoterapia, ômega 3
6	7 anos FC	U 121,3 C 4,7	III	4 meses	CC	Fluidoterapia, ranitidina, eritropoetina

7	10 anos FC	U 176,7 C 5	III	3 meses	CC	Fluidoterapia
8	4 anos FC	U 114,9 C 3,77	III	5 meses	CC, RR	Fluidoterapia, omeprazol, enalapril
9	10 anos MC	U 164 C 3,34	III	1 ano e 6 meses	RR	Fluidoterapia
10	8 anos MI	U 156,3 C 3,7	III	3 meses	R, CC	Fluidoterapia, furosemida, enalapril, quelante de fósforo
11	10 anos FC	U 129,7 C 2,19	III	4 meses	RR	Fluidoterapia, ketosteril®, quelante de fósforo

Legenda: MC, machos castrados; FI, Fêmea intacta; MI, Macho intacto; FC, Fêmea castrada; U, ureia; C, creatinina; IRIS, *International Renal Interest Society*; R, Ração manutenção; RR, Ração coadjuvante para pacientes renais; CC, comida caseira.

5.2.2. Manejo dos animais

O manejo dos cães incluídos no estudo pouco diferiu entre si, sendo a maioria cães de ambiente interno, cujo tutor tinha controle sobre alimentação e ingestão de água. No geral, a maioria dos animais se alimentava de ração coadjuvante para tratamento de doença renal, cuja composição tem baixo teor de proteína e fósforo, ou quando não adaptados à dieta, formulações caseiras.

Todos os animais tinham histórico de fluidoterapia endovenosa como tratamento inicial pós diagnóstico da DRC, sendo que três animais ainda faziam fluidoterapia caseira (uma vez na semana por via subcutânea) antes do início da terapia celular.

Durante o período experimental, um animal (animal 1) apresentou inflamação periodontal com abscesso oral, tendo de ser prescrito antibioticoterapia para o mesmo e um animal (animal 2) apresentou uma lesão cutânea que também teve que ser realizado intervenção com antibióticos. Nos outros animais não houve nenhuma intervenção no tratamento de suporte, sendo mantidos no manejo inicial.

5.2.3. Descongelamento Celular

Seguindo metodologia de descongelamento celular proposta por Vidane et al. (2016) , os criotubos foram descongelados em banho-maria a 37°C por 2 minutos. Em seguida, as células em suspensão foram transferidas para tubos Falcon e centrifugadas à 200 x por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2 mL de solução salina 0,9% e posteriormente foram centrifugadas nas mesmas condições, e o sobrenadante foi descartado. Para aplicação endovenosa, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução salina 0,9% para cada criotubo descongelado.

5.2.4. Transplante de CTMAs

Seguindo teste pré clínicos realizados por Vidane et al. (2016) e Pinheiro et al. (2016) a aplicação das células-tronco foi realizada por via endovenosa. Foi administrado aproximadamente $1 \times 10^6/5\text{kg}$ CTMAs em cada aplicação, que foram ressuspensas em solução salina 0,9%. Foram realizadas duas aplicações nos dias D0 e D30 (Figura 1). A veia cefálica foi canulada utilizando-se cateter nº 24, 22 ou 20, dependendo do porte do animal, e em seguida procedeu-se a injeção lenta das células. A administração endovenosa de soro fisiológico foi efetuada por meia hora com intuito de monitorar possíveis efeitos adversos pós-aplicação.

O acompanhamento clínico foi realizado nos dias D0, D7, D30 e D60. Em cada visita foi registrado a história clínica do paciente, efetuado o exame físico e a coleta de amostras de sangue para os exames hematológicos e bioquímicos e amostras de urina para urinálise e bioquímica urinária, bem como avaliação da filtração glomerular através do exame de *clearance* de creatinina (Figura 1).

Figura 1 Desenho experimental para aplicação da terapia celular em cães acometidos com DR

Legenda: CTMAs, Células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica; US, ultrassonografia

5.2.5. Exames hematológicos

Foram realizados quatro hemogramas em cada animal, sendo um no dia 0 (D0), antes da intervenção, e três pós-tratamento celular, nos dias 7, 30 e 60, com o objetivo de acompanhar a evolução do quadro clínico.

As amostras de sangue foram colhidas por venopunção da veia jugular com auxílio de agulha e seringa estéreis e posteriormente, as mesmas foram acondicionadas em tubo coletor contendo anticoagulante (EDTA). O exame de hematimetria e contagem total de leucócitos foram realizados de forma automatizada (aparelho hematológico automático (BC 2800 Vet, Mindray, China). Adicionalmente, os esfregaços sanguíneos foram corados pela coloração de Rosenfeld (BIRGEL, 1982) para avaliação morfológica dos elementos figurados e contagem diferencial de leucócitos.

5.2.6. Bioquímica sérica

Foram realizadas quatro avaliações das enzimas séricas (ureia, creatinina, fósforo, albumina e globulina) de cada animal, sendo um no dia 0 (D0), antes da intervenção, e três pós- tratamento celular, nos dias 7, 30 e 60 para acompanhamento do quadro clínico.

Para obtenção de soro sanguíneo foram colhidas amostras de sangue em tubo coletor sem anticoagulante. Na avaliação bioquímica sérica foi efetuada a dosagem da concentração de ureia, creatinina, albumina, globulina e fósforo com um analisador bioquímico automático (BS 120, Mindray, China), usando kits comerciais.

5.2.7. Urinálise

Para a urinálise foi colhida amostras de urina por cistocentese com a finalidade de evitar contaminação por microrganismos externos.

O exame físico da urina avaliou a densidade, o pH, a cor e o aspecto da amostra. Para realização do exame químico foi utilizado a tira reativa, ao qual permitiu avaliar alterações de pH e quantificar proteínas, glicose, cetonas, bilirrubina, sangue, urobilinogênio, nitrito, densidade e leucócitos. Ao exame microscópio do sedimento urinário foi avaliada a presença ou não de hemácias, bactérias, células epiteliais, muco, piócitos, cristais e cilindros (ALVES, 2004; STRASINGER; LORENZO, 2009; KIRSZTAJN, 2009).

5.2.8. Bioquímica Urinária

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

5.2.9. Clearance de creatinina

Foram realizadas coletas de amostras de sangue e urina para realização do *clearance* de creatinina em quatro momentos, no D0 (antes do tratamento celular), D7, D30 e no D60.

A metodologia para realização do *clearance* de creatinina foi adaptada de Finco (1995). Em resumo, para a realização de cateterização transuretral, a região geniturinária foi primeiramente higienizada. No primeiro momento, a urina pré-existente foi removida e após o completo esvaziamento da bexiga a sonda foi fechada e se iniciou a contagem do tempo. Em seguida, o animal foi acessado pela veia cefálica para realização de fluidoterapia de manutenção com solução fisiológica. Decorridos 30 minutos da fluidoterapia foi realizado um novo esvaziamento da bexiga, sendo registrado o volume total de urina produzido. Em seguida foi realizada a coleta de sangue (3 mL) para a quantificação de creatinina sérica.

Para avaliar a taxa de filtração renal a seguinte fórmula foi aplicada:

$$Cc(\text{mL}/\text{min}) = \frac{V \times U}{P \times T}, \text{ onde:}$$

Cc = Depuração de creatinina;

U = Concentração de creatinina na urina (mL/dL);

V = Volume urinário (mL/min);

P = Concentração plasmática de creatinina (mL/dL);

T = Tempo (minuto).

O valor de Cc foi dividido pelo peso corporal do animal e expresso em mL/min/kg, da mesma forma como realizado por Ferreira (2006).

A fluidoterapia de manutenção foi calculada de acordo com o proposto por Rabello (2012), sendo utilizado como base o cálculo de 40 mL/Kg/dia, e infundido a quantidade correspondente ao tempo proposto para realização do exame.

5.3. ULTRASSONOGRAFIA

Para realização do exame de ultrassonografia, foi recomendado para o animal jejum alimentar de 8 horas e água à vontade. Foi realizada tricotomia da região ventro-lateral do abdômen. O abdômen foi avaliado em decúbito lateral direito, lateral esquerdo e dorsal. Os rins foram avaliados com referência à posição topográfica, dimensões, forma, contorno e arquitetura interna.

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi baseada na comparação nos dados dos parâmetros clínicos (hemograma, bioquímica sanguínea, bioquímica urinária e análise de urina) ao longo do tempo (antes e depois da injeção celular). Foi verificada a homogeneidade de variâncias por meio de ANOVA e teste *Tuckey* e realizada análise dos dados e dos resíduos dos valores estimados por meio do *software* estatístico *prism*. Os resultados são apresentados como médias e erros padrão.

6. RESULTADOS

6.1. ISOLAMENTO DE CTMAs CANINO

Após coleta, o útero foi aberto e as membranas fetais separadas. Após 72 horas em cultivo em DMEM HIGH GLUCOSE, as células mesenquimais derivadas da membrana amniótica canina apresentaram-se aderidas ao plástico, com morfologia fibroblástica e com aproximadamente 80% de confluência nas garrafas de cultivo. As células foram monitoradas a cada 24 horas e mantiveram o padrão em cultivo até a segunda passagem, ao qual foram criopreservadas em nitrogênio líquido.

Após o descongelamento do material, as células apresentaram aderência ao plástico em 48 horas, porém houve diminuição da capacidade de proliferação.

Figura 2. Isolamento e cultivo das células-tronco proveniente do tecido amniótico.

Legenda: A) Tecido amniótico canino. B) Confluência celular na garrafa de cultivo. C) Pellet para contagem e congelamento. D) Criotubos com células-tronco para congelamento.

Fonte: Própria autoria

6.2. INJEÇÃO ENDOVENOSA DE CTMA

Dentre os animais que foram avaliados no processo de triagem, quatorze foram selecionados para participação do projeto, contudo três receberam apenas a primeira aplicação da terapia celular, estes foram excluídos da estatística. Dos onze animais que receberam as duas aplicações de 1×10^6 5kg de CTMAs, quatro vieram à óbito dias após a segunda aplicação celular devido a evolução natural da doença, portanto, apenas sete concluíram a avaliação durante os 60 dias.

Previamente ao tratamento celular, os animais passaram por exame físico e coleta de amostras para exames laboratoriais e em D7, D30 e D60. Os cães selecionados receberam infusão endovenosa lenta de CTMAs em D0 e D30. Durante e imediatamente após a infusão celular não foram observados efeitos adversos à injeção.

O exame físico nos animais não revelou nenhuma alteração aquém ao relatado pelos proprietários, que informaram inicialmente melhora na alimentação e vômitos que cessaram, o que foi confirmado pelo discreto ganho de peso em alguns animais, contudo esse parâmetro não apresentou significância estatística (tabela 5), além de manter seus parâmetros vitais normais e estáveis. Ao longo do acompanhamento, dois animais apresentaram alguma melhora clínica e se mantiveram estáveis durante todo o período de acompanhamento, dois animais apresentaram melhora clínica nos primeiros 30 dias, apresentando novamente sintomatologia da doença após esse período e os demais apresentaram melhora nos primeiros sete dias de tratamento, havendo uma piora geral da sintomatologia após.

Tabela 5. Médias ($\pm$ erros padrão) do peso dos animais nas diferentes fases de acompanhamento clínico dos cães com DRC com as CTMAs.

Variável	Fases do tratamento			
	D0 (n=11)	D7 (n=11)	D30 (n=7)	D60 (n=7)
Peso (kg)	14,28 $\pm$ 9,35	14,21 $\pm$ 9,35	14,19 $\pm$ 9,54	17,07 $\pm$ 9,51

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

6.3. AVALIAÇÃO LABORATORIAL

Os valores para referência do padrão de normalidade para cães domésticos usados para comparação com os achados laboratoriais foram descritos por Meyer & Harvey (2004).

Não foram observadas variações estatísticas significativas nos parâmetros do hemograma nas diferentes fases de acompanhamento clínico (tabela 6), estes parâmetros encontraram-se, no geral, dentro dos padrões da normalidade, contudo alguns animais apresentaram trombocitopenia e valores da série vermelha sanguínea (eritrócitos e hematócrito) abaixo dos padrões para cães, sendo estes compatíveis com anemia normocítica normocrômica arregenerativa. Quando possível, foi realizado exame de PCR (Reação em cadeia da polimerase) para descartar hemoparasitose em animais que apresentaram trombocitopenia persistente.

Tabela 6. Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros de hemograma e leucograma dos animais nas diferentes fases de acompanhamento clínico dos cães com DRC com as CTMAs.

Variável	Valor Referência	Fases do tratamento			
		D0 (n=11)	D7 (n=11)	D30 (n=7)	D60 (n=7)
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,5 - 8,5	4,18 $\pm$ 1,22	4,42 $\pm$ 1,42	4,55 $\pm$ 1,64	5,48 $\pm$ 1,80
Hemoglobina (g/dL)	12 - 18	10,01 $\pm$ 3,54	10,3 $\pm$ 3,18	10,64 $\pm$ 3,82	12,32 $\pm$ 4,55
Hematócrito (%)	37 - 55	30,74 $\pm$ 9,61	32,07 $\pm$ 10,01	32,68 $\pm$ 11,22	37,41 $\pm$ 13,14
VCM (fL)	60 - 77	73,54 $\pm$ 5,87	72,94 $\pm$ 6,04	72,33 $\pm$ 6,86	68,51 $\pm$ 6,63
HCM (pg)	21 - 26	23,63 $\pm$ 2,0	23,42 $\pm$ 2,31	23,45 $\pm$ 2,41	22,4 $\pm$ 2,27
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	200 - 300	3259,09 $\pm$ 1881,46	3901,82 $\pm$ 2371,07	3294,5 $\pm$ 1932,13	2567,14 $\pm$ 1582,93
Leucócitos Totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6,0 - 17	7981,82 $\pm$ 2869,78	8327,27 $\pm$ 4886,53	7445,45 $\pm$ 1623,8	7557,14 $\pm$ 3721,94

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

Os valores bioquímicos séricos de ureia, creatinina e fósforo mantiveram-se acima dos padrões de normalidade nos animais em todas as fases de acompanhamento, não apresentando

redução estatística significativa (tabela 7). Oito animais apresentaram hipoalbuminemia durante todo o período de acompanhamento, o que reflete a alta proteinúria (tabela 7 e 8).

Tabela 7. Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros de bioquímica sérica dos animais nas diferentes fases de acompanhamento clínico dos cães com DRC com as CTMAs.

Variável	Valor Referência	Fases do tratamento			
		D0 (n=11)	D7 (n=11)	D30 (n=11)	D60 (n=11)
Ureia (mg/dL)	21,4 – 59,92	126,80 $\pm$ 44,23	133,42 $\pm$ 53,03	160,97 $\pm$ 82,96	140,32 $\pm$ 66,28
Creatinina (mg/dL)	0,5 – 1,5	3,12 $\pm$ 1,27	3,27 $\pm$ 1,59	3,64 $\pm$ 1,77	2,68 $\pm$ 1,36
Proteína (g/dL)	6,0 – 8,0	7,56 $\pm$ 1,41	7,78 $\pm$ 1,42	7,46 $\pm$ 1,14	7,94 $\pm$ 1,06
Albumina (g/dL)	2,60 – 3,30	2,01 $\pm$ 0,68	1,95 $\pm$ 0,56	2,0 $\pm$ 0,63	2,08 $\pm$ 0,52
Globulina (g/dL)	2,70 – 4,40	5,60 $\pm$ 1,53	5,8 $\pm$ 1,68	5,49 $\pm$ 1,38	5,85 $\pm$ 1,28
Fósforo (mg/dL)	2,6 – 6,2	9,96 $\pm$ 4,52	9,15 $\pm$ 4,15	10,84 $\pm$ 5,68	8,29 $\pm$ 4,66

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

Não houve diferença estatística na urinálise (tabela 8) dos animais ao longo do tratamento, bem como no exame de *clearence* de creatinina, não houve diferença significativa apesar de alguns animais apresentarem melhora em algumas fases do acompanhamento. O exame de *Clearence* de creatinina foi realizado com o animal hidratado e sob infusão de fluidoterapia de manutenção para a realização do mesmo. No geral, a densidade urinária dos animais manteve-se baixa e havia proteinúria persistente em todas as fases de acompanhamento da maioria dos animais. O exame físico da urina mostrou-se linear durante todo o acompanhamento dos animais, não apresentando sedimentos anormais. Sete animais apresentaram bactérias na urinálise em alguma das fases de acompanhamento, indicando a presença de cistite.

Tabela 8. Médias ($\pm$ erros padrão) dos parâmetros de urinálise e do *clearence* de creatinina dos animais nas diferentes fases de acompanhamento clínico dos cães com DRC com as CTMA.

Variável	Valor Referência	Fases do tratamento			
		D0 (n=11)	D7 (n=11)	D30 (n=7)	D60 (n=7)
Densidade Urinária	1015-1045	1,01 $\pm$ 0,002	1,01 $\pm$ 0,003	1,01 $\pm$ 0,002	1,01 $\pm$ 0,001
pH	4,5-7,0	5,86 $\pm$ 1,07	5,54 $\pm$ 0,61	5,72 $\pm$ 0,95	6 $\pm$ 1,22
Creatinina	-	44,34 $\pm$ 20,53	45,38 $\pm$ 18,39	42,13 $\pm$ 11,38	42,88 $\pm$ 18,91
Proteína	-	276,55 $\pm$ 204,97	322,17 $\pm$ 271,39	309 $\pm$ 248,56	372,42 $\pm$ 246,52
UPC	<0,2	7,11 $\pm$ 5,22	6,79 $\pm$ 4,68	8,13 $\pm$ 6,46	9,57 $\pm$ 7,62
<i>Clearence</i> de creatinina mL/Kg/h	2	1,71 $\pm$ 0,95	1,64 $\pm$ 0,87	1,61 $\pm$ 0,69	1,55 $\pm$ 0,95

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

6.4. ULTRASSONOGRAFIA

Foram realizados dois exames de ultrassonografia nos animais que completaram o acompanhamento, sendo um antes de iniciar a terapia celular e o segundo no último dia de acompanhamento. Em geral, a morfologia renal inicial e padrões estruturais foram mantidos após a terapia com CTMA.

As mudanças iniciais observadas nos exames incluíram mudança de forma, redução de tamanho, perda de definição cortico-medular e presença de manchas hiperecoicas sugestivas de fibrose renal (Figura3).

Figura 3. Imagens ultrassonográficas da arquitetura e morfologia renal dos 11 cães domésticos utilizados neste estudo no D0.

Legenda: No geral, observa-se nos cortes ultrassonograficos dos rins diminuição de tamanho, perda da definição cortico-medular e fibrose renal. A enumeração é correspondente à lista dos animais do quadro 2.

Fonte: Própria autoria

7. DISCUSSÃO

As CTMA caninas neste estudo foram isoladas e expandidas com sucesso, as quais apresentaram aderência ao plástico de cultura, demonstrando morfologia fibroblastóide e alta capacidade de renovação, em consonância com as descrições realizadas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al. 2006), bem como as descritas por Filiolli e colaboradores (2014), Cardoso et al. (2016) e Saulnier et al. (2016) que também cultivaram CTMA canina, Vidane et al. (2013) em CTMA felina e Friendenstein et al. (1970) que descreveram CTMs a partir de medula óssea.

As células em nossa cultura apresentaram formação rápida do tapete celular em cultura primária, sugerindo uma forte sinalização parácrina. O contato celular e a sinalização parácrina desempenham um papel fundamental para na proliferação e migração dos CTMs, em conformidade com os achados de Togel et al. (2005); Bi et al. (2007) e Vidane et al. (2013).

A cultura celular foi expandida até segunda passagem para criopreservação, sendo aplicadas na terapia celular na terceira passagem. Vidane et al. (2014), Filiolli et al. (2014) e Saulnier et al. (2016) em seus estudos, indicaram que há uma alta taxa de proliferação e plasticidade das CTMA nas passagens três e quatro do cultivo celular.

Neste estudo, foi empregada a injeção endovenosa de células-tronco, como tratamento coadjuvante para doença renal crônica. A técnica já foi utilizada anteriormente em outros estudos por Quimby et al. (2013); Pinheiro et al. (2016) e Vidane et al. (2016). Os autores aferiram que a via é menos invasiva, causando menos efeitos adversos pós-aplicação. Neste contexto, vale ressaltar que Vidane et al., (2016) e Quimby et al., (2011) realizando o transplante celular por via intrarrenal, observaram a presença de hematúria como consequência de curto prazo da aplicação, bem como estresse de contenção e desvantagem da utilização de anestesia para realização do procedimento.

No presente estudo houve a realização de transplante alogênico de CTMAs em cães domésticos como modelo para doença renal crônica, não sendo verificadas alterações estatisticamente relevantes no que se refere às mudanças do ponto de vista laboratorial, o que desenhava com os relatos de Vidane et al. (2016) que transplantaram CTMAs no modelo

felino para DRC e demonstraram estabilização nos exames laboratoriais que se mantiveram dentro dos padrões normais e redução significativa nos níveis de creatinina sérica. Apesar das células utilizadas em ambos os estudos serem provenientes da mesma fonte e a via de administração ser a mesma, há diferenças, no que se refere o grau de evolução da doença levando-se em consideração a espécie (felino/canino), podendo influenciar no resultado de exames laboratoriais.

A dificuldade da manutenção dos pacientes com a ração coadjuvante para tratamento renal (baixo teor de fósforo) contribuiu para a hiperfosfatemia persistente, mesmo em animais que eram tratados com quelante de fósforo. Isto, juntamente com a alta proteinúria podem refletir na progressão rápida da doença, resultando em óbito de parte do grupo estudado. Segundo Jacob et al., (2005) a presença de proteinúria está associada a um prognóstico pobre e a uma progressão mais rápida da DRC quando comparado a pacientes sem proteinúria.

No que diz respeito ao exame ultrassonográfico foi verificado nos rins pré terapia celular: mudança de forma, redução de tamanho, perda de definição cortico-medular e presença de manchas hiperecoicas sugestivas de fibrose renal, não diferindo dos achados nos exames pós tratamento.

Contudo, estudos com terapia celular em modelos murinos com patologia induzida (SANGIDORJ et al. 2010; ASANUMA et al. 2011; CALDAS et al. 2017; ELSEWEIDY et al. 2017) e cães (LIM et al. 2016), indicaram uma melhora na inflamação intra-renal e retardo na progressão da fibrose. Vidane (2015) indicou que em modelo de doença renal induzida, a lesão é considerada aguda e o período entre a indução da doença e a aplicação das células é curto. Nestes casos, o processo inflamatório é exarcebado e as alterações não condizem com as condições na DRC natural, que geralmente leva longos períodos antes do diagnóstico. Diante do exposto, os resultados apresentados neste estudo, estão em conformidade com os achados de Vidane (2015).

Fatores como estágio da doença, quantidade de células inoculadas e vias de administração devem ser considerados quando nos referimos à terapia celular. Além disso, a migração celular para o órgão alvo, a fixação e a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares influenciam na resposta ao tratamento. Semedo et al. (2009) e Bianchi et al. (2014) demonstraram em seus estudos a migração de CTMs para os rins e a capacidade de

restauração da função renal em modelo murino para a patologia, porém, a extensa fibrose tecidual decorrentes do longo período de injúria no órgão no modelo apresentado neste estudo (cães acometidos naturalmente pela patologia), pode dificultar o processo de fixação celular. Malmegrim e colaboradores (2017) indicaram que pacientes humanos com diabetes tipo I tem grande comprometimento das células β pancreáticas, o que torna ineficiente a produção de insulina devido à lesão crônica e extensa e, mesmo com a utilização de terapia celular, não houve reversão das células já perdidas, consequentemente reabilitação do órgão de maneira ineficiente. Vidane (2015) sugere que a fibrose renal é um fator limitante para o processo de fixação e a difusão celular pelo tecido o que influencia na sua interação com a matriz e consequentemente, na diferenciação e reparação tecidual.

Portanto, nossos estudos mostram que em cães com lesão renal crônica há muito comprometimento do órgão, dificultando a difusão das células-tronco na matriz tecidual, o que torna o tratamento ineficiente.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo abordou sobre terapias com CTMAs em doença renal crônica canina, objetivando a avaliação da progressão da doença pós -terapia celular.

O tecido amniótico é uma importante fonte de células-tronco, que podem ser obtidas sem confrontar barreiras éticas, políticas e religiosas, de fácil cultivo, expansão e criopreservação para posterior uso.

O presente estudo mostrou controvérsias para o uso de CTMA na DRC quando há descompensação da doença, o que é refletido pela hiperfosfatemia e proteinúria persistentes, não indicando vantagens significativas, quando comparada aos tratamentos convencionais atualmente utilizados.

Baseando-se nos resultados obtidos neste estudo, é importante o aprofundamento sobre a temática apresentada, a fim de investigar aplicações de células-tronco em diferentes concentrações e estágios da doença (estágio 1 – fase inicial), aumentando a expectativa de vida, o sucesso do tratamento e proporcionando maior bem-estar ao animal e testes que mostram a lesão renal com maior antecedência evitando o comprometimento do órgão extensamente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULRAZZAK, H.; MOSCHIDOU, D.; JONES, G.; GUILLOT, P.V. **Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues.** J. Roy. Soc. Interface 2010. Disponível em: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/7/Suppl_6/S689>. Acesso em: 01 Mar. 2016.
- ABENSUR, H. **Biomarcadores na Nefrologia.** Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2011. Disponível em: <<http://arquivos.sbn.org.br/pdf/biomarcadores.pdf>>. Acesso em: 20 Mar. 2016.
- ALVES, M.A. **Diagnóstico de Doença Renal Crônica:** Avaliação de Proteinúria e Sedimento Urinário. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v 26.(3), p. 17-18. 2004
- APERS, C.E; CHANG, A. O rim. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. **Robbin & Cotran: bases patológicas das doenças.** 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 1375p.
- ASAHARA, T.; KAWAMOTO, A. **Review:** Endothelial Progenitor Cells for Postnatal Vasculogenesis. *Amer. Jour. of Physio.- Cell Physiology*, v. 287, p. 572- 579, 2004.
- ASANUMA, H.; VANDERBRINK, B.A.; CAMPBELL, M.T.; HILE, K.L.; ZHANG, H.; MELDRUM, D.R.; MELDRUM, K.K. **Arterially delivered mesenchymal stem cells prevent obstruction-induced renal fibrosis.** *J. Surg. Res.* v. 168 (1), p. e51–9. 2011.
- BARTGES, J.W. **Chronic kidney disease in dogs and cats.** *Veterinary Clinics of north America: Small Animal Practice.* v 42, p. 669-692. 2012
- BELLOMO, R.; KELLUM, J.A.; RONCO, C. **Acute renal failure:** time for consensus. *Intens. Care Med.* v 27, p. 1685-1688. 2001.
- BIANCHI, F.; SALA, E.; DONADEI, C.; CAPELLI, I.; MANNA, G. **Potential advantages of acute kidney injury management by mesenchymal stem cells.** *WJSC.* V 6 (5), p644-650. 2014.
- BI, B.; SCHMITT, R.; ISRAILOVA, M.; NISHIO, H.; CANTLEY, L.G. **Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect.** *J. Am. Soc. Nephrol.* v. 18 (9), p. 2486–96. 2017.
- BIRGEL, E.H. Hematologia Clínica veterinária. In: **conferencia anual da sociedade paulista de medicina veterinária**, São Paulo:1982, p. 50.
- BOIANI, M.; SCCTHOLER, H.R. **Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells.** *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* p 877-884. 2005
- CALDAS, H.C.; LOJUDICE, F.H.; DIAS, C.; FERNANDES-CHARPIOT, I.M.M.; BAPTISTA, M.; KAWASAKI-OYAMA, R.S.; SOGAYAR, M.C.; TAKIYA, C.M.; ABBUD-FILHO, M. **Induced Pluripotent Stem Cells Reduce Progression of Experimental Chronic Kidney Disease but Develop Wilms' Tumors.** *Stem Cells*, v.2017. 2017

CARDOSO MT, PINHEIRO A.O., VIDANE A.S, CASALS J.B., OLIVEIRA V.C, GONÇALVES N.J.N, MARTINS D.S. AMBRÓSIO C.E. **Characterization of teratogenic potential and gene expression in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells**. Reproduction in Domestic Animals, 2016.

COSTA, J. A. C.; VIEIRA NETO, O. M.; NETO, M.N. **Insuficiência Renal Aguda**. Revista de Medicina, v 36, 2003.

CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária** . 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

DE LOOR, J.; DAMINET, S.; SMETS, P.; MADDENS, B.; MEYER, E. **Urinary Biomarkers for Acute Kidney Injury in Dogs: Review**. Journal of Veterinary Internal Medicine, v.27. p. 998–1010. 2013

DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M. **Células-tronco e fatores de creCTimento na reparação tecidual**. Ciência Veterinária nos Trópicos, v. 11, p. 167-169, 2008.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., HORWITZ, E. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells**. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 8, 315–317, 2006.

ELLIOTT, D.A.; LEFEBVRE, H. **Chronic Renal Disease: the importance of nutrition**. In: PIBOT, P. ET AL. Encyclopedia of Canine Clinical Nutrition Royal Canin. Ithaca: ROYAL CANIN, p.252-282. 2009.

ELSEWEIDY, M.M.; ASKAR, M.E.; ELSWEFY, S.E.; Shawky, M. Nephrotoxicity Induced by Cisplatin Intake in Experimental Rats and Therapeutic Approach of Using Mesenchymal Stem Cells and Spironolactone. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-14. 2017

FERNANDES, R.A.; WENCESLAU, C.V.; REGINATO, A.L.; KERKIS, I.; MIGLINO, M.A. **Derivation and characterization of progenitor stem cells from canine allantois and amniotic fluids at the third trimester of gestation**. Placenta, v 33(8), p. 640-644. 2012.

FERREIRA, P.C.C. Avaliação da hemodiafiltração no período Peri-peratorio da ovário-salpingo-histerectomia, em cadelas com piometras e refratárias ao tratamento conservador da insuficiência renal aguda. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

FILIOLI, U.M.; DELL'AQUILA, M.E.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; VENTURA, M.; CATACCHIO, C.R.; MARTINO, N.A.; VALENTINI, L. **Characterization and in vitro differentiation potency of early-passage canine amnion- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as related to gestational age**. Mol Reprod Dev. v. 81(6), p. 539-51. 2014.

FINCO, D. R., **Evaluation of renal functions**. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. Canine and Feline Nephrology and Urology. Baltimore: Williams e Wilkins. p.29-46, 1995.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. **The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.** Cell Tissue Kinet. v.3, p.393-403,1970

FUKUCHI, Y.; NAKAJIMA, H.; SUGIYAMA, D.; HIROSE, I.; KITAMURA, T.; TSUJI, K. **Human Placenta derived cells have mesenchymal stem/ progenitor cell potential.** Stem Cells. v.22, p. 649-658, 2004.

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

GRAUER, G.F. **Insuficiência Renal.** In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Medicina interna de pequenos animais. 2 ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2001. cap. 44, p. 493-499.

HALL, J.E. **Guyton & Hall: Tratado de fisiologia médica.** 13 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 1176p.

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

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

INTERNATIO RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS), 2016, in <<http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.html>>, acesso em 24 nov. 2016

JACOB, F.; POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A.; NEATON, J.D.; KIRK, C.A.; ALLEN, T.A.; SWANSON, L.L. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. **J Am Vet Med Assoc.** v 226, p.393–400. 2005

KIRSZTAJN, G.M. **Avaliação de função renal.** Jornal. Brasileiro de Nefrologia. v 31, 2009.

KÖNIG, H.E.; MAIERL, J.; LIEBICH, H.G. Órgãos urinários (Organa urinaria). In: KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. **Anatomia dos animais domésticos.** 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 788p.

LARSEN, J.A.; PARKS, E.M.; HEINZE, C.R.; FASCETTI, A.J. Evaluation of recipes for home-prepared diets for dogs and cats with chronic kidney disease. **JAVMA**, v.240 (5), p. 532-538. 2012.

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

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

LIM, C.; HAN, J.; KIM, S.; LEE, C.; PARK, H. **Evaluation of autologous bone marrow–derived mesenchymal stem cells on renal regeneration after experimentally induced acute kidney injury in dogs.** AJVR, v77 (2), p. 208-217. 2016.

MALMEGRIM, K.C.; DE AZEVEDO, J.T.; ARRUDA, L.C.; ABREU, J.R.; COURI, C.E.; DE OLIVEIRA, G.L.; PALMA, P.V.; SCORTEGAGNA, G.T.; STRACIERI, A.B.; MORAES, D.A.; DIAS, J.B.; PIERONI, F.; CUNHA, R.; GUILHERME, L.; SANTOS, N.M.; FOSS, M.C.; COVAS, D.T.; BURT, R.K.; SIMÕES, B.P.; VOLTARELLI, J.C.; ROEP, B.O.; OLIVEIRA, M.C. **Immunological Balance Is Associated with Clinical Outcome after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Type 1 Diabetes.** Front Immunol, v.8 (167), p. 1-13. 2017.

MCTAGGART, S.J.; ATKINSON, K. **Mesenchymal stem cells:** immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. Nephrology (Carlton), v. 12, p. 44–52, 2007.

MEESUK, L.; TANTRAWATPAN, C.; KHEOLAMAI, P.; MANOCHANTR, S. **The immunosuppressive capacity of human mesenchymal stromal cells derived from amnion and bone marrow.** Biochemical Biophysical Reports, v.8, p. 34-40. 2016

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

MIMEAULT, M.; BATRA, S.K. **Conuse review:** recente advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and câncer therapies. Stem Cells, v.24, p. 2319-1245, 2006.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o Laboratório:** princípios e interpretações. 4^a Edição. São Paulo: Editora Médica Missau, 2003.

NOTOMI, M.K.; KOGIKA, M.M.; IKKESAKI, J.Y.H.; MONTEIRO, P.R.G.; MARQUESI, M.L. **Estudo retrospectivo de casos de insuficiência renal crônica em cães no período de 1999 a 2002.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 43, suplemento, p. 12-22. 2006

O'NEILL, D.G.; ELLIOTT, J.; CHURCH, D.B.; MCGREEVY, P.D.; THOMSON, P.C.; BRODBELT, D.C. **Chronic Kidney Disease in Dogs in UK Veterinary Practices:** Prevalence, Risk Factors, and Survival. Journal of Veterinary Internal Medicine, v.27. p. 814–821. 2013

PARK, SANG-BUM; SEO, MIN-SOO; KIM, HYUNG-SIK; KANG, KYUNG- SUN; KIM, HYUNG-SIK; KANG, KYUNG-SUN **Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells.** PLOS ONE, v7 (9). 2012.

PAROLINI, O.; CARUSO, M. **Review:** Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: Na update. Placenta, v. 25, p. 186-195, 2011.

PINHEIRO, A.O.; CARDOSO, MT.; VIDANE, A.S.; CASALS, J.B.; PASSARELLI, D.; ALENCAR, A.L.F.; SOUSA, R.L.M.; FANTINATO-NETO, P.; OLIVEIRA, V.C.; LARA, V.M.; AMBRÓSIO, C.E. **Controversial results of therapy with mesenchymal stem cells in the acute phase of canine distemper disease.** Genet. and Mol. Res. V 15 (2), 2016.

Disponível em: <http://www.geneticsmr.com/year2016/vol15-2/pdf/gmr8310.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2016.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** Science, v.284, p.143-147, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/284/5411/143>>.

Acesso em: 23 mar. 2016.

POLZIN, D.J. **Chronic kidney disease** In: Bartges J, Polzin DJ, editors. Nephrology and urology of small animals. Ames: Wiley-Blackwell; p. 433–471. 2011.

QUIMBY, J.M.; WEBB, T.L.; GIBBONS, D.S.W. **Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: A pilot study.** Journal of Feline Medicine and Surgery, v.13 (6), p. 418-426, 2011.

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

QUIRINO, B. F. ; CALDAS, R.A. **Técnicas Laboratoriais em Bioquímica.** 2 ed. Brasília: Editora Universa, v. 1, p. 33-52. 2006.

RABELO, R.C. **Emergências de pequenos animais: condutas clínicas e cirúrgicas no paciente grave.** 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RUBIN, S. I. **Chronic renal failure and its management and nephrolithiasis.** In: Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, v. 27, n. 6, p.331-1354, 1997.

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

SANGIDORJ, O.; YANG, S.H.; JANG, H.R.; LEE, J.P.; CHA, R.H.; KIM, S.M.; LIM, C.S.; KIM, Y.S. **Bone marrow-derived endothelial progenitor cells confer renal protection in a murine chronic renal failure model.** American Journal of Physiology- Renal Physiology, v. 299 (2), p. F325–35. 2010

SAULNIER, N.; LORIAUA, J.; FEBREA, M.; ROBERT, C.; RAKIC, R.; BONTE, T.; BUFF, S.; MADDENS, S. **Canine placenta: A promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells?** Veterinary Immunology and Immunopathology, v.171, p. 47–55. 2016.

SEMEDO, P.; CORREA-COSTA, M.; ANTONIO, M. C.; et al. **Mesenchymal Stem Cells Attenuate Renal Fibrosis Through Immune Modulation and Remodeling Properties in a Rat Remnant Kidney Model.** *Stem Cells.* v. 27, p.3063–3073. 2009

SENIOR, F.D. Doenças do sistema urinário. In: DUNN, J. K. **Tratado de Medicina de pequenos animais.** São Paulo: Roca, p.607-644, 2001.

SZUSTER, D.A.C.; SILVA, G.M.S.; ANDRADE, E.I.G.; ACÚRCIO, F.A.; CAIAFFA, W.T.; GOMES, I.C.; et al. **Potencialidades do uso de bancos de dados para informação em saúde: o caso das Terapias Renais Substitutivas (TRS) – morbidade e mortalidade dos pacientes em TRS.** *Revista Medica de Minas Gerais,* v.19(4), p. 308-16. 2009.

STRASINGER, S.K., LORENZO, M.S. **Urinálise e Fluidos Corporais.** 5ª ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2009.

TOGEL, F.; HU, ZHU, Z.; WEISS, KWEISS, K.; ISAAC, J.; LANGE, CLANGE, C.; WESTENFELDER, C. **Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms.** *American Journal Physiology- Renal Physiology.* v. 289 (1), p. F31–42. 2005.

TOGEL, F.; WEISS, K.; YANG, Y.; HU, Z.; ZHANG, P.; WESTENFELDER, C. **Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury.** *American Journal of Physiology - Renal Physiology,* v. 292: 1626–1635, 2007.

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

VIDANE, A.S. Modelo clínico de uso de células-tronco mesenquimais da membrana amniótica para o tratamento da insuficiência renal crônica em gatos. **Tese (doutorado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

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

VIDANE, A. S.; SOUZA, A.F.; SAMPAIO, R.V.; BRESSAN, F.F.; PIERI, N.C.; MARTINS, D.S.; MEIRELLES, F.V.; MIGLINO, M.A.; AMBROSIO, C.E. **Cat amniotic membrane multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation.** *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications,* v.7, p.71-78. 2014.

VIDANE AS PINHEIRO, AO, CASALS JB, PASSARELLI D, MCFNS HAGE, MARTINS DS, BUENO RS, AMBRÓSIO C.E. **Transplantation of amniotic membrane-derived**

multipotent cells ameliorate and delay the progression of chronic kidney disease in cats. *Reproduction in Domestic Animals*, v 52 (2), p.316-326. 2017

WARE, W.A. **Insuficiência Renal.** In: NELSON, R.W., COUTO, C.G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*, 3 Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, p. 583-597. 2006.

WATTS, A.E.; YEAGER, A.E.; KOPYOV, O.V. NIXON, A.J. **Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model.** *Stem Cell Research & Therapy*, v.2:4. 2011.

WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; LIZIER, N. F.; PIGNATARI, G. C.; KERKIS, I. **Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver and bone marrow.** *Tissue Engineering Part A*, v.17, p. 2165-2176. 2011.

ANEXOS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Teste pré-clínico em insuficiência renal crônica canina, com o uso de células-tronco amnióticas", protocolada sob o CEUA nº 5162210916, sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Ambrosio** - 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 Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 26/10/2016.

We certify that the proposal "Evaluation of experimental treatment of dogs with chronic renal failure with the use of amnion canine stem cells", utilizing 10 Dogs (males and females), protocol number CEUA 5162210916, under the responsibility of **Carlos Eduardo Ambrosio** - 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 Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 10/26/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2016** a **02/2018**

Área: **Biociência Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 18 anos**

N: **10**

Linhagem: **qualquer**

Peso: **1 a 30 kg**

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

FOLDER DE DIVULGAÇÃO DO PROJETO “MEU CÃOZINHO RENAL”

- **Como funciona o projeto?**

Dez cães com insuficiência renal crônica serão selecionados para o estudo, onde serão realizados exames e terão acompanhamento profissional capacitado para receberem o tratamento gratuito com células-tronco.

- **Como participar?**

Se o seu cãozinho é diagnosticado com IRC cuja causa não seja cálculos renais, neoplasias ou causa congênita (de nascimento), contate-nos!

Ingrid Gomes
Médica veterinária
Mestranda Programa Biociência Animal

Contatos:
(19) 99544-2161
Ingrid.gomes@usp.br

Dúvidas frequentes

O tratamento vai curar o meu cãozinho?

O tratamento com células-tronco tem como objetivo promover qualidade de vida ao seu cãozinho através da diminuição ou melhora dos sintomas clínicos. A insuficiência renal crônica é uma doença irreversível, por isso o tratamento visa prolongar o tempo de vida do animalzinho.

O meu cãozinho tem insuficiência renal crônica mas é muito velhinho, ele pode participar do estudo?

A seleção de animais é independente da raça, sexo ou idade do animal, desde que não haja outra doença concomitante como, por exemplo, cardiopatia ou neoplasia.

Com o uso das células-tronco devo interromper o tratamento que o veterinário que acompanha meu cãozinho prescreveu?

Não. O estudo não interferirá no tratamento prescrito para seu animalzinho, devendo este ser cumprido conforme recomendações do médico veterinário.

Ingrid da Silva Gomes - Médica Veterinária
(19) 99544-2161 - ingrid.gomes@usp.br

QUADROS COM VALORES DOS HEMOGRAMAS E LEUCOGRAMAS DOS ANIMAIS PARTICIPANTES DO PROJETO

Hemácias (x10⁶/μL)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	3,01	6,81	6,29	2,95	2,85	3,64	3,6	3,84	4,81	3,48	4,73
D7	3,78	6,16	6,07	3,37	2,83	6,92	3,44	3,62	3,7	3,35	5,38
D30	3,39	6,63	6,24	3,47	3,66	7,77	3,69	3,62	3,32	2,99	5,34
D60	2,59	6,98	7,16	5,45	3,55	5,59	7,05				

Hemoglobina (g/dL)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	7,1	17,3	14,6	5,3	6,8	9,3	9	8,9	11,9	8,5	11,5
D7	8,6	15,1	13,6	6	6,9	15	8,8	8,9	9,4	8,6	12,4
D30	7,8	16,4	14,2	6,1	8,6	17	9,8	8,2	8,1	7,8	13,1
D60	6,3	16,5	15,9	10	7,6	12,2	17,8				

Hematócrito (%)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	22,2	49,4	43,9	17,1	22,9	27,4	27,7	29	36,2	27,4	35
D7	27,3	44,4	41,8	19,5	23	50,3	26,6	27	27,5	26,2	39,2
D30	25	49	43,9	19,3	26,4	50,8	30,3	26,9	24,5	22,9	40,5
D60	19,3	50,1	50,5	30,5	25,5	35,1	50,9				

VCM (fL)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	73,8	72,6	69,8	58	80,4	75,3	75,6	75,52	75,3	78,7	74
D7	72,2	72,1	68,9	57,9	81,3	72,7	77,3	74,6	74,3	78,2	72,9
D30	73,7	73,9	70,4	55,6	74,1	65,4	82,1	74,3	73,8	76,6	75,8
D60	74,5	71,8	70,5	56	71,8	62,8	72,2				

HCM (pg)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	23,6	24,2	23,2	18	23,9	25,5	25	23,2	24,7	24,4	24,3
D7	22,8	24,5	22,4	17,8	24,4	21,7	25,6	24,6	25,4	25,7	22,8
D30	23	24,7	22,8	17,6	23,7	21,9	26,6	22,7	24,4	26,1	24,5
D60	24,3	23,6	22,2	18,3	21,4	21,8	25,2				

Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	244.000	229.000	416.000	384.000	120.000	138.000	424.000	633.000	497.000	22.000	478.000
D7	301.000	216.000	490.000	484.000	82.000	197.000	507.000	831.000	714.000	158.000	312.000
D30	368.000	273.000	229.000	309.000	69.000	145.000	451.000	536.000	749.000	179.000	316.000
D60	88.000	424.000	323.000	424.000	62.000	131.000	345.000				

Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	5.400	6.400	13.700	5.300	6.400	11.100	5.900	11.700	6.900	8.300	6.700
D7	5.600	7.600	9.500	5.900	5.900	5.200	5.800	12.200	21.600	5.500	6.800
D30	7.800	6.800	9.000	4.000	8.500	7.100	5.200	8.100	9.000	7.400	9.000
D60	4.900	6.800	6.100	6.500	7.300	5.500	15.800				

QUADROS COM VALORES DOS EXAMES DE BIOQUÍMICA SÉRICA DOS ANIMAIS
PARTICIPANTES DO PROJETO

Proteínas Totais (g/dL)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	6,6	7,2	8,2	6,6	11	6,2	7,8	5,8	7,6	7,8	8,4
D7	6,4	7,2	7,2	7	11,4	6,6	7,6	6,8	8	8,6	8,8
D30	7,6	7,6	6,8	6,4	10,2	6,2	8,2	6,2	7,3	8	7,6
D60	8,8	8	7,4	7,8	9,6	6,2	7,8				

Ureia (mg/dL)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	201,5	61,7	91,8	106,8	70,2	121,3	176,7	114,9	164	156,3	129,7
D7	141,1	62,5	65,4	118,6	63,3	112,5	168,3	154,3	200,1	182,1	199,5
D30	225,2	59,9	64,9	128,9	90,9	140,1	132,3	157	214,9	340	216,6
D60	230,2	74,3	53,5	157,7	117,1	134,9	214,6				

Creatinina (mg/dL)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	4,37	2,03	1,64	2,05	1,57	4,7	5	3,77	3,34	3,7	2,19
D7	3,79	2,07	1,53	2,08	1,25	3,44	6,46	4,37	4,43	4,39	2,24
D30	4,64	1,79	1,67	2,26	1,65	3,56	6,42	3,71	3,49	6,7	4,16
D60	4,4	1,58	1,68	2,05	1,74	4,38	13,89				

**Albumina
(g/dL)**

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	2,26	3,19	2,89	1,36	1,35	1,43	2,47	1,39	2,53	1,95	1,36
D7	2,33	3,02	2,58	1,24	1,39	1,72	2,49	1,49	1,56	1,84	1,88
D30	2,06	2,97	3,01	1,66	1	1,48	2,49	1,35	2,09	2,09	1,82
D60	2,35	2,29	2,85	1,7	1,35	1,67	2,41				

**Globulina
(g/dL)**

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	4,34	4,65	5,31	5,24	9,65	4,77	5,33	4,41	5,07	5,85	7,04
D7	4,07	4,18	4,62	5,76	10,01	4,88	5,11	5,31	6,44	6,5	6,92
D30	5,54	4,63	3,79	4,74	9,2	4,72	5,71	4,9	5,51	5,91	5,78
D60	6,45	5,71	4,55	6,1	8,25	4,53	5,39				

**Fósforo
(mg/dL)**

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	13,61	2,89	18,91	5,01	7,45	9,4	7,53	14,37	11,81	9,76	8,86
D7	9,96	3,03	4,29	3,76	8,27	11,3	7,82	14,04	15,15	10,34	12,79
D30	15,17	3,53	3,35	4,93	8,17	11,73	8,07	13,88	12,49	19,16	18,8
D60	7,91	3,25	3,67	7,26	8,72	10,1	17,18				

QUADROS COM VALORES DA URINÁLISE, BIOQUÍMICA URINÁRIA E
CLEARANCE DE CREATININA DOS ANIMAIS PARTICIPANTES DO PROJETO

Densidade

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	1,01	1,014	1,008	1,01	1,018	1,01	1,012	1,012	1,012	1,014	1,014
D7	1,01	1,014	1,01	1,012	1,022	1,008	1,012	1,012	1,014	1,016	1,014
D30	1,012	1,014	1,01	1,01	1,018	1,012	1,012	1,012	1,014	1,014	1,014
D60	1,014	1,014	1,01	1,014	1,016	1,012	1,012				

Ph

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	5	5,5	5	6,5	6	8	5	6	5	7,5	5
D7	5	6,5	5,5	5,5	6	6	5	6,5	5	5	5
D30	5	5	5,5	7	6	8	5,5	5,5	5	5,5	5
D60	5	5	5,5	7,5	5,5	8	5,5				

Creatinina

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	25,66	91,5	21,04	30,24	69	34,5	52,22	37,5	36,75	40,75	48,6
D7	25,93	0,24	37,44	42,05	90,75	32	50,6	47,25	49,5	58,5	41,24
D30	39,25	59,75	40,25	33,27	63,18	27,97	50,46	30	36,63	42,72	40
D60	75,5	44,27	40,68	16,48	42,15	27	54,1				

Proteína

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	297	23,5	16,1	245,3	580	437,5	70,4	605	295	322,5	149,8
D7	324,5	18,9	20,1	357,7	919,1	258,9	70,9	670	365	280	258,8
D30	200	21,5	36,1	211,8	832	502,7	124,1	610	300,3	310,5	250
D60	437,5	27,7	84,6	491,5	728,8	500	336,9				

UPC

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	11,57	0,26	0,76	8,11	8,4	12,68	1,35	16,13	8,03	7,91	3,1
D7	12,51	0,24	0,54	8,51	10,13	8,1	1,4	14,18	8	4,8	6,3
D30	5,09	0,36	2	6,37	13,17	17,97	2,46	20,33	8,2	7,27	6,3
D60	5,78	0,62	2,08	16,48	17,29	18,51	6,23				

Clarence de creatinina (mL/kg/h)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
D0	0,43	2,5	3	1,77	2	1,8	0,86	0,48	3,1	2,1	0,78
D7	1	2,3	3,4	1,6	2,3	1,73	0,8	0,42	2	1,8	0,7
D30	1,5	2,4	2,8	1,8	2,1	1,7	1,2	0,44	1,6	1,6	0,64
D60	0,46	2,6	2,7	1	2	1,75	0,4				