

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

MICHELE MILISTETD

**TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS EM CÃES
COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

(Cell therapy with mesenchymal stromal cells in dogs with chronic renal disease)

CURITIBA

2020

MICHELE MILISTETD

**TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS EM CÃES
COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

(Cell therapy with mesenchymal stromal cell in dogs with chronic renal disease)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Clínica e Cirurgia Veterinária, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Vicente
Michelotto Jr.

Coorientadora: Prof. Dra. Carolina Zaghi
Cavalcante.

CURITIBA

2020

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Pamela Travassos de Freitas – CRB 9/1960

M664t
2020

Milistetd, Michele

Terapia celular com células estromais mesenquimais em cães com doença renal crônica = (*Cell therapy with mesenchymal stromal cells in dogs with chronic renal disease*) / Michele Milistetd ; orientador: Pedro Vicente Michelotto Jr. ; coorientadora: Carolina Zaghi Cavalcante. – 2020.
50 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2020
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças. 2. Insuficiência renal crônica. 3. Nefropatias.
4. Qualidade de vida. 5. Terapia celular. I. Michelotto Jr., Pedro Vicente.
II. Cavalcante, Carolina Zaghi. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDD 20. ed. – 636.70896

TERMO DE APROVAÇÃO

MICHELE MILISTETD

TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS EM CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Ana Paula Sarraf Lopes

Profa. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich

Prof. Dr. José Ademar Villanova Júnior

Curitiba, 22 de setembro de 2020.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIACÕES	viii
AGRADECIMENTOS	ix
FORMATO DA DISSERTAÇÃO	x
RESUMO GERAL	xi
ABSTRACT	xii

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO	13
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. HIPÓTESES	21
REFERÊNCIAS	22

CAPÍTULO 2

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS, DERIVADA DE TECIDO ADIPOSE, EM 5 CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1 Animais, aspectos éticos e delineamento do estudo	28
2.2 Avaliação clínica	29
2.3 Avaliação laboratorial	29
2.4 Terapia celular	30
2.5 Controle de qualidade e caracterização das CEMs	31
2.5.1 Imunofenotipagem	31
2.5.2 Teste de congelamento	31
2.5.3 Diferenciação celular	32
2.5.4 Esterilidade	32
2.5.5 Viabilidade celular	32
2.6 Análise estatística	33

3. RESULTADOS	34
4. DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO 3	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
ANEXOS	44

LISTA DE QUADRO E TABELAS

CAPÍTULO 1

QUADRO 1 Estadiamento e subestadiamento da doença renal crônica em cães, segundo a Sociedade Internacional de Interesse Renal14

CAPÍTULO 2

TABELA 1 Raça, idade e estágio IRIS dos cães com doença renal crônica tratados com células estromais mesenquimais alogênicas derivadas de tecido adiposo.....28

TABELA 2 Amostras de células estromais mesenquimas derivadas de tecido adiposo utilizadas para tratamento de cães com doença renal crônica e avaliadas quanto a viabilidade celular33

TABELA 3 Dados clínicos (peso e pressão arterial sistólica) e laboratorias (eritrócitos e leucócitos sanguíneos, creatinina, SDMA, pH venoso, densidade urinária e RPC_u) de cães com doença renal crônica tratados com células estromais mesenquimais alogênicas derivadas do tecido adiposo34

TABELA 4 Sinais clínicos e comportamento (de acordo com os tutores) de cães com doença renal crônica, antes e após o tratamento com células estromais mesenquimais alogênicas derivadas do tecido adiposo35

LISTA DE ABREVIACÕES

- DRC – Doença renal crônica
- CEMs – Células estromais mesenquimais
- SDMA – Dimetilarginina simétrica
- RPC_u – Razão proteína/creatinina urinária
- IRIS – Sociedade Internacional de Interesse Renal
- TFG – Taxa de filtração glomerular
- PAS – Pressão arterial sistólica
- CEUA - Comitê de ética no uso de animais
- PUC-PR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná
- SRD – Sem raça definida
- MC – Macho castrado
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- SFB – Soro fetal bovino

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela saúde, a minha família e amigos, por sempre me apoiarem nos estudos e não me deixarem desistir.

Agradeço a empresa Biocell, em especial a Patrícia F. Malard e a Hilana Brunel pelo apoio, incentivo e disponibilidade.

Agradeço a todos dos Hospitais Veterinários Clinivet e Santa Mônica, pelo apoio para poder utilizar a infraestrutura para a realização do projeto e aos clínicos nefrologistas por encaminharem seus pacientes.

Agradeço também, a Pontifícia Universidade Católica do Paraná pela oportunidade do mestrado, e ao meu orientador Pedro Vicente Michelotto Jr e coorientadora Carolina Zaghi Cavalcante pela disponibilidade, e ensinamentos.

Ao Núcleo de Terapia Celular da PUC-PR, especialmente a Lidiane Maria Boldrini Leite por realizar o processo de viabilidade celular.

E um agradecimento especial aos pacientes e aos seus proprietários que permitiram e confiaram para que esse projeto fosse realizado.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema, os objetivos, hipóteses do estudo e referências. O capítulo 2 “Efeitos da administração intravenosa de células estromais mesenquimais alogênicas, derivadas de tecido adiposo, em 5 cães com doença renal crônica.” Trata-se de artigo científico completo, contendo referências. O capítulo 3 finaliza esta dissertação com conclusões gerais e considerações finais deste trabalho e sugestões para estudos futuros.

RESUMO GERAL

A doença renal crônica (DRC) é uma doença irreversível e progressiva, que provoca um constante estado inflamatório nos cães. O tratamento com terapia celular é pouco estudado em animais domésticos e ainda não existem informações sobre a segurança no uso de células estromais mesenquimais (CEMs) alogênicas, e bem como de seus efeitos, em cães com DRC. O objetivo do presente estudo foi avaliar a segurança do tratamento de CEMs derivadas de tecido adiposo, em cães com DRC, em momentos pós administração e durante o período de acompanhamento de 153 dias. Adicionalmente procurou-se avaliar seus efeitos sobre parâmetros de exame físico, biomarcadores de função (creatinina, uréia, fósforo, dimetilarginina simétrica, sódio, potássio, cálcio iônico sérico, hemogasometria venosa, hemograma e densidade urinária) e de lesão renal (razão proteína/creatinina urinária e cilindrúria). Cinco cães com DRC receberam três aplicações de CEMs alogênicas derivadas de tecido adiposo com intervalos de 21 dias entre as aplicações, via intravenosa, na dosagem de $1 \times 10^6 \pm 10\%$ de CEMs alogênicas por Kg de peso vivo do animal. As avaliações clínica e laboratorial foram realizadas a cada aplicação, 30 e 120 dias após a última aplicação de CEMs. Adicionalmente, obteve-se relato dos tutores a respeito das manifestações clínicas dos animais, antes e após o tratamento. Como resultado, evidenciou-se que os animais investigados não apresentaram nenhum efeito adverso imediatamente após a infusão, nem ao longo dos 153 dias que se seguiram. Um animal tratado apresentou redução da creatinina, de 3,5 mg/dL para 2,4 mg/dL do dia 0 para o dia 153, ganhou 100 gr de peso vivo, bem como melhora na disposição. Considerando o grupo de estudo, não se observou diferença estatística, nos biomarcadores de lesão e função renal ao longo do tempo de estudo ($p>0,05$). Como conclusão, a terapia com CEMs alogênicas derivadas de tecido adiposo mostrou-se segura para cães com DRC, e evidenciou efeitos benéficos, o que pode representar potencial terapêutico para essa condição, necessitando de novos estudos.

Palavras-chave: Cão, Doença renal, Nefropatias, Qualidade de vida, Segurança, Terapia celular.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is an irreversible and progressive disease that causes a constant inflammatory state in dogs. There are few studies about treatment with cell therapy in domestic animals and still has no information on the safety in the use of allogeneic mesenchymal stromal cells (MSCs), and their effects in dogs with CKD. The objective of the present study was to evaluate the safety of the treatment of adipose-derived MSCs, in dogs with CKD, in the moment after infusion and during the follow-up period of 153 days; additionally, we tried to evaluate its effects on some function biomarkers (creatinine, blood urea, phosphorus, SDMA, sodium, potassium, serum ionic calcium, venous blood gas analysis, erythrogram and urine specific gravity) and kidney injury (urine protein to creatinine ratio and cylindruria). Five dogs with CKD received three infusions of MSCs with an interval of 21 days, intravenous administration, about $1 \times 10^6 \pm 10\%$ of allogeneic MCSs per kg of animal body weight. Clinical and laboratory evaluation was performed at each infusion, and 30 and 120 days after the last infusion of MSCs. Additionally, owner's reports were obtained regarding the clinical changes of the animals. As a result, we demonstrated the safety of cell therapy with adipose-derived allogeneic MSCs, in dogs with CKD, considering that the animals investigated did not present any adverse effects immediately after the infusion, nor over the following 153 days. Two animals showed a decrease in the creatinine serum 3,5 mg/dL to 2,4 mg/dL in day 0 to day 153, 100 gr body weight gain, as well as an improvement in the disposition of the treated dogs. Considering the study group, there was no statistical difference in the biomarkers of injury and renal function over the study period ($p>0.05$). It is concluded that therapy with adipose-derived allogeneic MSCs derived is safety for dogs with CKD and has therapeutic potential for this condition.

Keywords: Dog, Kidney diseases, Nephropathies, Quality of life, Cell therapy, Safety.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

Os rins são órgãos que mantêm a homeostase por meio das funções de filtração, reabsorção, secreção, e excreção de catabólitos (Bartges, 2012). A doença renal crônica (DRC) é uma doença irreversível, progressiva, que frequentemente acomete cerca de 25% dos cães (Lund et al. 1999 e Pelander et al. 2015). É caracterizada pela anormalidade estrutural ou funcional dos rins, levando à perda de função renal com evolução de pelo menos 3 meses (Polzin, 2011).

Apesar do caráter crônico, a DRC provoca constante estado inflamatório no paciente que, em conjunto com o estresse oxidativo, leva à várias consequências graves da doença como anemia, alterações nutricionais, disfunções endoteliais e imunológicas (Kogika et al., 2015).

Os sinais clínicos geralmente são inespecíficos, e observados nas fases mais avançadas da doença. Sendo as manifestações mais comuns a poliúria, polidipsia, perda de peso, má qualidade de pelagem, halitose, estomatite, gastroenterite e desidratação (Cowgill et al., 2016). Complicações da DRC incluem distúrbios metabólicos tais como hiperfosfatemia, acidose metabólica, hiper ou hipocalemia, anemia, proteinúria e hipertensão arterial (Polzin, 2011).

A acidose metabólica ocorre geralmente devido a retenção de ácidos que são excretados normalmente, maior retenção de ácidos metabólicos, maior produção de amônia e diminuição da recuperação de bicarbonato. A acidose metabólica está associada a hiporexia/anorexia, hipocalemia e fraqueza muscular, catabolismo proteico endógeno e agravo da azotemia (Bartges, 2012).

Os rins estão envolvidos também na regulação do equilíbrio eletrolítico. Os eletrólitos são livremente filtrados no glomérulo, e reabsorvidos no túbulo contorcido proximal, porção espessa da alça de Henle, túbulo contornado distal e ducto coletor, o que estiver em excesso será eliminado pela urina. Um distúrbio eletrolítico comum em cães com DRC é a hipocalemia, consequência da hiporexia ou anorexia, poliúria e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Bartges, 2012).

A anemia resultante da DRC é multifatorial, sendo a diminuição da produção de eritropoietina pelos rins doentes um fator importante (Bartges, 2012). A gravidade da anemia se correlaciona positivamente com as concentrações séricas de creatinina, isso quer dizer que a anemia ocorre nos pacientes que apresentem azotemia moderada à grave. Além de contribuir

para letargia, anorexia e fraqueza, a anemia grave pode exacerbar a progressão da DRC devido à diminuição da oferta de oxigênio para o rim residual, como modalidade terapêutica, indica-se a reposição de eritropoietina para estimular a eritropoiese e correção da anemia, com consequente retardo da progressão da doença (Fiocchi, 2017).

A perda urinária de proteína pode ocorrer secundariamente à lesão glomerular, túbulo-intersticial ou mista. A proteinúria pode promover lesão renal progressiva por vários mecanismos, incluindo toxicidade mesangial, sobrecarga tubular e hiperplasia, toxicidade de proteínas filtradas específicas e indução de moléculas pró-inflamatórias. A redução da proteinúria retarda a progressão da doença. O tratamento da proteinúria renal envolve diminuição da filtração e consequentemente da perda glomerular de proteínas, principalmente albumina (Bartges, 2012).

Segundo Cowgil et al. (2016), uma característica da DRC é a progressão, mas a patogenia ainda não está bem definida, e provavelmente é multifatorial. Pois alguns animais com DRC mantêm função renal estável e aparentemente não progridem. Vários fatores de risco foram documentados, incluindo idade, hipertensão, proteinúria, agentes infecciosos, doenças endócrinas, predileções por raças, insuficiência renal aguda e doenças cardíacas. A natureza progressiva da DRC pode ser sinalizada pelo aparecimento e agravamento de características clínicas evidentes da disfunção renal, incluindo inapetência, perda de peso, polidipsia, poliúria, distúrbios de micção, letargia e vômitos. Independentemente da progressão da DRC no paciente, todos parecem compartilhar uma característica comum de estresse ativo ou lesão estrutural no rim, o que promove uma inflamação intersticial ativa e fibrose.

Para estabelecer o diagnóstico da DRC é necessário unir as informações de anamnese e exame físico, com os exames complementares laboratoriais e de imagem. Tradicionalmente, na rotina utiliza-se ureia e creatinina sérica para o diagnóstico, no entanto, esses biomarcadores somente se encontrarão alterados quando o comprometimento renal for de 75% ou mais, sendo considerados, portanto, biomarcadores tardios da redução da taxa de filtração glomerular (TFG) (Polzin, 2011).

Outros exames empregados para o diagnóstico da DRC são a urinálise, razão proteína/creatinina urinária (RPC_U) e ultrassonografia abdominal. No exame de urina do doente renal crônico observa-se redução da densidade urinária, pode-se observar proteinúria e ocasional cilindrúria, quando a doença está em momento de agudização. Quando houver perda urinária de proteína de origem renal, a RPC_U , que é um exame quantitativo, pode indicar a perda de proteínas pelos glomérulos ou pelos túbulos. No entanto, somente terá valor

diagnóstico se esta proteinúria for persistente, e ausência de sedimento urinário ativo (leucócitos, eritrócitos, bactérias e/ou espermatozóides), com proteína plasmática normal, que podem indicar proteinúria pós renal e pré renal respectivamente. O exame de ultrassonografia renal, por sua vez, buscará por alterações anatômicas do órgão, que podem ser: no formato, contorno, tamanho, diferenciação entre as camadas cortical e medular e mesmo, presença de mineralização tissular, no entanto, a ausência de alterações ultrassonográficas não descarta a DRC (Grauer, 2007).

Mais recentemente, a quantificação da dimetilarginina simétrica (SDMA) tem sido utilizada como marcador mais precoce para o diagnóstico da DRC. Trata-se de um aminoácido excretado pela urina que demonstra ter alta correlação com a taxa de filtração glomerular (TFG), mostrando alterações da TFG antes dos outros marcadores convencionais. No entanto, esse biomarcador não é capaz de diferenciar os quadros agudos dos crônicos (Ernst, 2018).

A Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS), foi criada para promover o entendimento científico da doença renal em pequenos animais, liderada por um conselho de 15 veterinários independentes, de onze países diferentes, com especial experiência em nefrologia. A IRIS sugere a classificação da DRC em estágios (de 1 a 4) utilizando-se dois biomarcadores de TFG, a creatinina sérica e o SDMA (Quadro 1), objetivando a padronização da nomenclatura para favorecer o diagnóstico precoce e o reconhecimento da doença, bem como fornecer diretrizes para o tratamento em cada momento, além de auxiliar no prognóstico (IRIS, 2020).

Quadro 1 – Estadiamento e subestadiamento da doença renal crônica em cães, segundo a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS) (IRIS, 2020).

	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3	Estágio 4
Creatinina (mg/dL)	< 1,4	1,4-2,8	2,9-5,0	> 5
SDMA (µg/dL)	< 18	18-35	36-54	> 54
RCP _U	sem proteinúria <0,2	proteinúria limite 0,2-0,5	proteinúria >0,5	
PAS (mmHg)	normotenso <140	pré-hipertenso 140-159		

SDMA, dimetilarginina simétrica; RCP_U, razão proteína/ creatinina urinária; PAS, pressão arterial sistólica.

No estágio 1, não há azotemia, o SDMA está normal ou discretamente elevado. O paciente pode apresentar algumas outras anormalidades anatômicas renais aos exames de imagem, na palpação renal, na biópsia renal, a presença de proteinúria de origem renal, aumento de duas vezes o valor basal de creatinina sérica do paciente ou de SDMA em amostras

seriadas. A concentração persistentemente elevada do SDMA ($>14 \mu\text{g/dl}$) pode ser usada para diagnosticar a DRC precoce. No estágio 2, a creatinina e o SDMA estão discretamente elevados, os sinais clínicos estão ausentes ou são discretos, como eventual desidratação e disorexia, poliúria com polidipsia compensatória. No estágio 3, haverá azotemia moderada e sinais clínicos poderão estar presentes. Se os sinais clínicos estiverem ausentes, pode ser considerado estágio 3 inicial, enquanto que, a presença de muitos sinais clínicos pode justificar o estágio 3 tardio. Finalmente, no estágio 4 há azotemia intensa sendo que os sinais clínicos estarão presentes e poderão ser graves e geralmente correlacionam-se com complicações sistêmicas (IRIS, 2020).

A IRIS sugere o uso do SDMA para estadiamento, com o objetivo de aumentar a acurácia no diagnóstico de redução da TFG. O SDMA pode ser um marcador mais sensível, pois é menos influenciado pela perda de massa corporal magra. Nos cães, se o SDMA for persistente acima de $18 \mu\text{g/dL}$, em um animal com creatinina abaixo de $1,4 \text{ mg/dL}$ (IRIS DRC estágio 1, com base em creatinina), esse paciente deverá ser estadiado e tratado como paciente IRIS DRC estágio 2. Se o SDMA for persistentemente acima de $35 \mu\text{g/dL}$ e a creatinina estiver entre $1,4$ e $2,8 \text{ mg/dL}$ (IRIS DRC estágio 2, com base em creatinina), esse paciente deverá ser estadiado e tratado como um paciente IRIS DRC estágio 3. No caso do SDMA estar acima de $54 \mu\text{g/dL}$ em um cão com creatinina entre $2,9$ e $5,0 \text{ mg/dL}$ (IRIS DRC estágio 3, com base em creatinina), esse paciente será estadiado e tratado como um paciente IRIS DRC estágio 4 (IRIS, 2020).

Após o estadiamento da DRC, é recomendado o subestadiamento da doença com base nas avaliações seriadas da proteinúria, pela RPC_u e da pressão arterial sistólica. Para avaliação da proteinúria é importante que se confirme a origem renal da perda de proteínas, excluindo infecções e inflamações do trato urinário (IRIS, 2020). Para a mensuração da pressão arterial sistólica recomenda-se que o animal esteja tranquilo, e que sejam realizadas de cinco a sete aferições, em pelo menos duas ocasiões diferente (Acierno et al., 2018). Após o diagnóstico e estadiamento da DRC deve-se instituir o tratamento individualizado para cada paciente (IRIS, 2020). O tratamento conservador da DRC consiste em tratamento de suporte e sintomático projetado para corrigir excessos e déficits dependendo das situações que ocorrem (Bartges, 2012).

O tratamento deve ser direcionado de acordo com cada estágio da doença, no entanto, adaptações na terapia devem acompanhar a resposta clínica individual. O tratamento tem dois objetivos principais: retardar a progressão da doença, preservando os néfrons funcionais, e

reduzir os sinais clínicos, melhorando a qualidade de vida do paciente. Dentre as principais diretrizes para o tratamento estão: descontinuar o uso de fármacos nefrotóxicos, identificar e tratar anormalidades pré e pós renais, utilização de dietas específicas, manter a hidratação, tratar as infecções do trato urinário, a hipertensão, a proteinúria, a hiperfosfatemia, a acidose metabólica e anemia, caso estejam presentes (IRIS, 2020).

Uma modalidade terapêutica importante é o uso de dietas restritivas. Halfen e colaboradores (2019) observaram que alimentar cães com dieta comercial restritiva formulada para doentes renais (que apresenta restrição de proteína, sódio e fósforo, contendo suplementação de ácidos graxos insaturados, antioxidantes e prebióticos) por seis meses em combinação com o tratamento de suporte foi eficaz no controle da uremia, na manutenção do equilíbrio ácido-base, da pressão arterial, da capacidade antioxidante e redução da produção de citocinas inflamatórias, bem como na manutenção do escore corporal e massa muscular em cães com DRC. Já Hall e colaboradores (2018) observaram que num período de 12 meses, cães DRC estágio 1 alimentados com dieta comercial restritiva formulada para doentes renais, apresentaram estabilização da função renal com base na diminuição das concentrações de uréia, creatinina e SDMA séricos, e os tutores notaram melhora na qualidade de vida. Um estudo clássico realizado por Jacob e colaboradores (2002) mostrou que a dieta comercial restritiva formulada para doentes renais reduziu o número de crises urêmicas e aumentou o tempo médio de sobrevivência de cães azotêmicos com DRC. Esses resultados corroboram com a recomendação de Polzin (2013) de administrar “dieta renal” aos cães com DRC a partir do estágio 1 da IRIS.

O prognóstico da DRC é reservado a desfavorável, dependendo do estágio da doença. Caso o diagnóstico seja realizado nas fases iniciais, é possível que o animal conviva muitos anos com essa condição. No entanto, em caso de diagnóstico tardio a expectativa de vida do paciente é baixa (Rudinski, 2018).

Para as doenças renais, bem como para muitas doenças crônicas, têm-se proposto a utilização de terapias celulares. O objetivo principal desta modalidade terapêutica para os pacientes doentes renais é melhorar a qualidade de vida dos mesmos, bem como retardar a progressão da doença. Acredita-se que estes objetivos sejam alcançados com a administração de células estromais mesenquimais (CEMs), pois apresentam capacidade de diminuir a inflamação local em diferentes órgãos e tecidos (Sutton, 2002).

A terapia celular com CEMs tem apresentado avanços em diversas especialidades dentro da medicina veterinária. As CEMs são capazes de originar tipos celulares necessários

em processos de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, células renais, cardíacas, entre outras (Monteiro et al., 2010; Gade et al., 2012).

A obtenção de CEMs pode ser feita a partir de diferentes locais do organismo do indivíduo, tais como o tecido adiposo, cordão umbilical, cartilagem, líquido sinovial, músculos, tendões (Carvalho, 2001; Bittencourt et al., 2006; Nakage e Santana, 2006; Colomé et al., 2008; Oliveira et al., 2010) mas, na Medicina Veterinária as fontes mais utilizadas de CEMs são a medula óssea e o tecido adiposo (Chung et al., 2012; Barussi et al., 2016; Menarim et al., 2020).

Em animais domésticos, as CEMs do tecido adiposo são obtidas através de incisão cirúrgica na região abdominal, parede torácica, ou mais comumente, na base da cauda. Procedimentos realizados diariamente em clínicas e hospitais veterinários, como orquiectomias, ovariectomias e cesarianas, favorecem a maneira de obtenção deste material, viabilizando a coleta, sem precisar de intervenções cirúrgicas específicas para o isolamento do tecido adiposo (Vidal et al., 2007; Mambelli et al., 2009; Martinello et al., 2011).

As CEMs são facilmente isoladas, cultivadas e manipuladas *in vitro* (Marques, 2016) e devem apresentar as seguintes características: ser aderente ao plástico quando mantido em condições de cultura padrão usando frascos de cultura de tecidos, $\geq 95\%$ da população CEMs deve expressar CD105, CD73 e CD90, conforme medido por citometria de fluxo. Além disso, essas células devem não ter expressão ($\leq 2\%$ positivas), de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA classe II. E devem ser capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob condições padrões de diferenciação *in vitro* (Dominici et al., 2006).

As CEMs obtidas a partir de tecido adiposo parecem ser seguras para aplicação alogênica sem perigo de rejeição pelo sistema imunológico do receptor, pois essas células parecem possuir baixo grau de expressão de complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC I) e ausência de expressão de MHCII na superfície celular (Le Blanc et al., 2003). Dessa forma, torna-se possível fazer o uso de CEMs alogênicas provenientes de banco de células, em casos de urgência na aplicação, como em casos de insuficiência renal aguda ou na agudização de doentes renais crônicos.

Os efeitos das CEMs nos tecidos lesionados ocorrem devido à liberação de moléculas bioativas (de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas, receptores de fatores de crescimento) que permitem uma interação com o meio no qual elas são transplantadas, de forma que, ao se unir com as células do organismo, modulam a resposta inflamatória e mitose das

células que estão relacionadas ao processo de reparação tecidual e promovem a imunomodulação (Huss, 2000; Bobis et al., 2006; Caplan, 2009).

A aplicação das células, seja local (*in situ*) ou intravenosa, ocorre com o objetivo de promover múltiplos efeitos tais como efeitos imunomodulatórios, através da secreção de citocinas reguladoras e ativação de células imunológicas reguladoras, e capacidade de aumentar o reparo celular através da secreção de mediadores anti-inflamatórios (Morigi et al., 2016).

Diante deste cenário, acredita-se que a diminuição do processo inflamatório intersticial renal pode melhorar as funções dos néfrons, e auxiliar o tratamento de doenças renais, sejam agudas ou crônicas, pois constituem uma fonte promissora de proliferação e diferenciação celular (Yao e Bai, 2013).

Quanto a segurança da aplicação de CEMs alogênicas derivadas do tecido adiposo, podemos observar que existem trabalhos com diferentes doses e doenças. Villanueva e colaboradores (2019), avaliaram a eficácia e a segurança de CEMs autólogas derivadas do tecido adiposo, para o tratamento da DRC, com a infusão intravenosa, em seis pacientes humanos, utilizando o protocolo de aplicação de 1×10^6 células/kg de massa corporal, onde não observaram efeitos adversos e podendo ser benéfico o uso aos pacientes. Villatoro e colaboradores (2018) demonstraram em 26 cães que a dose $1,5 \times 10^6$ células/Kg de massa corporal de CEMs alogênica de origem de tecido adiposo, em uma única administração via intravenosa, não produziu efeitos adversos onde foi acompanhado com os perfis hematológicos e bioquímicos séricos que foram obtidos no dia do tratamento e aos 1, 3 e 6 meses. Em um outro trabalho, com 13 cães com osteoartrite de cotovelo que receberam três infusões intravenosas de CEMs, administradas em intervalos de duas semanas, na dose de $1-2 \times 10^6$ células/Kg de massa corporal, os animais foram monitorados durante a infusão e por 20 minutos após a infusão, e seus tutores foram aconselhados a supervisionar seus cães após a alta; observou que as CEMs não causaram nenhum efeito colateral nos cães (Olsen et al., 2019). Neste outro trabalho, com 11 cães com doença inflamatória intestinal que receberam uma única infusão intravenosa de CEMs alogênica derivada de tecido adiposo, na dose de 2×10^6 células/Kg de massa corporal, também não apresentaram nenhuma reação aguda ou efeito colateral (Pérez-Merino et al., 2015).

As CEMs têm sido estudadas como possível tratamento para as doenças renais. Em dois gatos, Quimby e colaboradores (2011) infundiram CEMs autólogas derivadas de tecido adiposo em três pontos na cortical renal guiado por ultrassom, demonstrando leve diminuição da

creatinina sérica, e sem quaisquer efeitos adversos. Em outro estudo do mesmo grupo, foi investigada a infusão intravenosa de diferentes quantidades de CEMs alogênicas, que não resultaram em efeitos benéficos à função renal e provocaram efeitos adversos nos animais tratados, tais como vômito e aumento da frequência respiratória. Ainda, investigaram a infusão intravenosa de 2×10^6 CEMs alogênicas a cada duas semanas, completando três infusões; nesta pesquisa não foram observados efeitos adversos, mas também não se observou melhora clínica após o tratamento, sugerindo-se que os efeitos da terapia celular devam ser avaliados a médio e longo prazo (Quimby et al., 2013). E Thomson e colaboradores (2019), num estudo clínico (Fase 1) infundiram CEMs autólogas em gatos via artéria renal, demonstrando ser uma possível via de administração, não observando-se qualquer efeito adverso em até três meses após o tratamento.

Na DRC, os estudos em animais de companhia são escassos. Não se tem informações sobre o uso das CEMs em cães com DRC, e seus possíveis efeitos na função renal e qualidade de vida. Portanto, em função da ausência de estudos que comprovem a segurança da aplicação intravenosa de CEMs alogênicas em cães com DRC, e visto que o potencial terapêutico dessas células pode trazer melhora de qualidade de vida desses pacientes, esse trabalho teve como objetivos avaliar a segurança dessa terapia celular e seus efeitos na função renal desses pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a segurança e investigar efeitos da terapia celular com células estromais mesenquimais (CEMs) alogênicas, derivadas de tecido adiposo, em cães com doença renal crônica (DRC).

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a segurança do tratamento de CEMs alogênicas nos cães com DRC no momento da infusão, pós imediato e 120 dias após administração.

Avaliar o efeito da aplicação de CEMs sobre biomarcadores de função renal (creatinina, uréia, fósforo, SDMA, sódio, potássio, cálcio iônico sérico, hemogasometria venosa, eritrograma e densidade urinária) em cães com DRC durante o tratamento e 120 dias após administração.

Avaliar o efeito da aplicação de CEMs sobre biomarcadores de lesão renal (RPC_u e cilindrúria) em cães com DRC durante o tratamento e 120 dias após administração.

Avaliar o efeito da aplicação de CEMs sobre a massa corporal em cães com DRC durante o tratamento e 120 dias após administração.

Avaliar o efeito da aplicação de CEMs sobre a pressão arterial sistólica em cães com DRC durante o tratamento e 120 dias após administração.

3. HIPÓTESES

H0: As CEMs alogênicas administradas por via intravenosa em cães com DRC não têm efeito benéfico.

H1: É seguro administrar CEMs alogênicas por via intravenosa em cães com DRC.

H2: As CEMs alogênicas administradas por via intravenosa em cães com DRC resultam em melhora clínica avaliadas por meio do exame físico e de exames complementares.

H3: As CEMs alogênicas administradas por via intravenosa em cães com DRC resultam em melhora da qualidade de vida dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- Acierno, M. J., Brown, S., Coleman, A.E., *et al.* (2018) ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal Veterinary Internal Medicine* 32(6),1803-1822
- Bartges, J.W. (2012) Chronic kidney disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 42(4),669-692
- Barussi, F.C., Bastos, F.Z., Leite, L.M., *et al.* (2016) Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 232, 35-42
- Bittencourt, R.A.C., Pereira, H.R., Felisbino, S.L., Murador P., *et al.* (2006) Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. *Acta Ortopédica Brasileira* 14, 22-24
- Bobis, S., Jarocha, D., Majka, M. (2006) Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemical Cytobiological* 44, 215-230
- Caplan, A.I. (2009) Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *Journal of Pathology* 217, 318-324
- Carvalho, A.C.C. (2001) Células-tronco: medicina do futuro. *Revista Ciência Hoje* 29, 26-31
- Chung, D.J., Hayashi, K., Toupadakis, C.A., *et al.* (2012) Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. *Research in Veterinary Science* 92, 66-75
- Colomé, M., Gomes, C., Crosignani, N., *et al* (2008) Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. *Ciência Rural* 38, 2529-2534
- Cowgill, L.D., Polzin, D.J., Elliott, J., *et al.* (2016) Is Progressive Chronic Kidney Disease a Slow Acute Kidney Injury? *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 46(6), 995-1013
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., *et al.* (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4), 315-317
- Ernst, R., Ogeer, J., McCrann, D., *et al.* (2018) Comparative performance of IDEXX SDMA Test and the DLD SDMA ELISA for the measurement of SDMA in canine and feline serum. *PLoS One* 13(10)

Halfen, D.P., Caragelasco, D.S., Nogueira, J.P.S., *et al.* (2019) Evaluation of Electrolyte Concentration and Pro-Inflammatory and Oxidative Status in Dogs with Advanced Chronic Kidney Disease under Dietary Treatment. *Toxins (Basel)* 12(1), 3

Hall, J.A., Fritsch, D.A., Yerramilli, M., *et al.* (2018) A longitudinal study on the acceptance and effects of a therapeutic renal food in pet dogs with IRIS-Stage 1 chronic kidney disease. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 102(1), 297-307

Fiocchi, E.H., Cowgill, L.D., Brown, D.C., *et al.* (2017) The Use of Darbepoetin to Stimulate Erythropoiesis in the Treatment of Anemia of Chronic Kidney Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 31(2), 476-485

Gade, N.E., Pratheesh, M.D., Nath, A., *et al.* (2012) Therapeutic potential of stem cells in veterinary practice. *Veterinary World* 5, 499-507

Huss, R. (2000) Isolation of primary and immortalized CD34-hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells* 18, 1-9

Grauer, G.F. (2007) Measurement, interpretation, and implications of proteinuria and albuminuria. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 37(2), 283-287

International Renal Interest Society (2019)
http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf [accessado 02 outubro 2019]

Jacob, F., Polzin, D.J., Osborne, C.A., *et al.* (2002) Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous chronic renal failure in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220(10),1495

Le Blanc, K., Tammika, C., Rosendahl, K. (2003) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* 31, 890–896

Kogika, M.M., Lustoza, M.D., Hagiwara, M.K., *et al.* (2015) Evaluation of oxidative stress in the anemia of dogs with chronic kidney disease. *Veterinary Clinical Pathology* 44(1), 70-78

Lund, E.M., Armstrong, P.J., Kirk, C.A. (1999) Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *Journal of American Veterinary Medical Association* 214(9),1336-1341

Mambelli, L.I., Santos, E.J., Frazão, P.J., *et al.* (2009) Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Engineering: Part C Methods* 15, 87-94

- Marques, A.R.P.A. (2016) Terapia com células estaminais derivadas do tecido adiposo em cães com sequelas neurológicas da esgana. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa
- Martinello, T., Bronzini, I., Maccatrozzo, L., *et al.* (2011) Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Research in Veterinary Science* 91, 18-24
- Menarim, B.C., Gillis, K.H., Oliver, A., *et al.* (2020) Inflamed synovial fluid induces a homeostatic response in bone marrow mononuclear cells in vitro: Implications for joint therapy. *The FASEB Journal* 34, 4430– 4444
- Monteiro, B.S., Argolo Neto, N.M., Del Carlo, R.J. (2010) Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, 40
- Morigi, M., Rota, C., Remuzzi, G.. (2016) Mesenchymal Stem Cells in Kidney Repair. *Methods in Molecular Biology* 1416, 89-107
- Nakage, A.P.M., Santana, A.E. (2006) Células-tronco hematopoiéticas em cães. *Ciência Rural* 36, 325-329
- Pelander, L., Ljungvall, I., Egenvall, A., *et al.* (2015) Incidence of and mortality from kidney disease in over 600,000 insured Swedish dogs. *Veterinary Record* 176(25), 656
- Oliveira, G.K., Raiser, A.G., Olsson, D., *et al.* (2010) Células-tronco mononucleares e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62, 72-79
- Olsen, A., Johnson, V., Webb, T., *et al.* (2019) Evaluation of Intravenously Delivered Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Elbow Osteoarthritis in Dogs: A Pilot Study. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 32(3),173-181
- Pérez-Merino, E. M., Usón-Casaús, J.M., Zaragoza-Bayle, C., *et al.* (2015) Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Clinical and laboratory outcomes. *Veterinary Journal* 206(3), 385-390.
- Polzin, D.J. (2011) Chronic kidney disease in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 41(1),15-30.
- Quimby, J. M., Webb, T. L., Gibbons, D. S., & Dow, S. W. (2011) Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: A pilot study. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 13, 418–426

- Quimby, J. M., Webb, T. L., Habenicht, L. M., & Dow, S. W. (2013) 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*, 4, 48
- Rudinsky, A.J, Harjes, L.M., Byron, J., *et al.* (2018) Factors associated with survival in dogs with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32(6),1977-1982
- Sutton, T. A., Fisher, C.J., Molitoris, B.A. (2002) Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney International* 62(5), 1539-1549
- Thomson, A.L., Berent, A.C., Weisse, C. & Langston, C.E. (2019) Intra-arterial renal infusion of autologous mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: Phase I clinical trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 33, 1353–1361
- Vidal, M.A., Kilroy, G.E., Lopez, M.J., *et al.* (2007) Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary Surgery* 36, 613-622
- Villanueva, S., González, F., Lorca, E., *et al.* (2019) Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for treating chronic kidney disease: A pilot study assessing safety and clinical feasibility. *Kidney Research and Clinical Practice* 38(2), 176-185
- Villatoro, A.J, Hermida-Prieto, M., Fernández, V., *et al.* (2018) Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety. *Veterinary Record* 183(21), 654
- Yao, L., Bai, H. (2013) Review: Mesenchymal stem cells and corneal reconstruction. *Molecular Vision* 19, 2237-2243

CAPÍTULO 2

EFFECTS OF INTRAVENOUS ADMINISTRATION OF ALLOGENEIC MESENCHYMAL STROMAL CELLS, DERIVED FROM ADIPOSE TISSUE, IN FIVE DOGS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE.

Objectives: The objective of the present study was to evaluate the safety of the treatment of adipose-derived mesenchymal stromal cells, in dogs with chronic kidney disease, in the moment, after infusion and during the follow-up period of 120 days.

Materials and Methods: Five dogs with chronic kidney disease received three intravenous infusions of mesenchymal stromal cells, with an interval of 21 days, about $1 \times 10^6 \pm 10\%$ of allogeneic mesenchymal stromal cells per kilogram of body weight, clinical and laboratory (creatinine, blood urea, phosphorus, SDMA, sodium, potassium, serum ionic calcium, venous blood gas analysis, blood count, urine specific gravity, urine protein to creatinine ratio and cylindruria) evaluation were performed at the moments of each infusion, and 30 and 120 days after the last infusion of mesenchymal stromal cells treatment.

Results: There were no adverse effects in the investigated animals, immediately after each infusion, evaluated from owner's care, nor over the 120 days of clinical follow-up. Two animals showed a decrease in the creatinine serum, body weight gain, as well as an improvement in the disposition of the treated dogs.

Clinical Significance: It is concluded that therapy with adipose-derived allogeneic mesenchymal stromal cells derived is safety for dogs with chronic kidney disease, and presented positive results for a potential therapeutic use, which must be further investigated.

1. INTRODUÇÃO

O tratamento da doença renal crônica (DRC) tem por objetivos retardar a progressão da doença, preservar os néfrons funcionais e reduzir as manifestações clínicas, promovendo qualidade de vida aos pacientes (IRIS, 2020).

Após o diagnóstico e estadiamento da DRC, deve-se instituir o tratamento individualizado para cada paciente. A Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS) recomenda o tratamento de acordo com os estágios da doença, no entanto, certas adaptações na terapia devem acompanhar a resposta clínica de cada paciente. Contudo, ainda não existe um tratamento que evite a progressão da doença. A natureza progressiva da DRC pode ser sinalizada pelo aparecimento e agravamento de características clínicas evidentes da disfunção renal. Independentemente da progressão da DRC no paciente, todos parecem compartilhar uma característica comum de estresse ativo ou lesão estrutural no rim, o que promove uma inflamação intersticial ativa e fibrose. Dentre as principais diretrizes para o tratamento da DRC estão descontinuar o uso de fármacos nefrotóxicos, identificar e tratar anormalidades pré e pós renais, utilização de dietas terapêuticas, manter a hidratação, e tratar as infecções do trato urinário, a hipertensão, a proteinúria, a hiperfosfatemia, a acidose metabólica e anemia, caso estejam presentes (IRIS, 2020).

Neste contexto, as células estromais mesenquimais (CEMs) têm sido estudadas como possível tratamento para as doenças renais, em humanos. Recentemente, Villanueva et al. (2019) avaliaram a eficácia e a segurança CEMs autólogas derivadas do tecido adiposo, para o tratamento da DRC, com a infusão intravenosa, em seis pacientes humanos utilizando o protocolo de aplicação de 1×10^6 células/kg de massa corporal, onde não observou efeitos adversos e possível benefício aos pacientes. Em dois gatos, Quimby et al. (2011) infundiram CEMs autólogas derivadas de tecido adiposo em três pontos na cortical renal guiado por ultrassom, demonstrando leve diminuição da creatinina sérica, e sem quaisquer efeitos adversos. Em outro estudo do mesmo grupo, foi investigada a infusão intravenosa de diferentes quantidades de CEMs alogênicas criopreservadas, que não resultaram em efeitos benéficos à função renal e provocaram efeitos adversos nos animais tratados, tais como vômito e aumento da frequência respiratória. Ainda, investigaram a infusão intravenosa de 2×10^6 CEMs alogênicas a cada duas semanas, completando três infusões; nesta pesquisa não foram observados efeitos adversos, mas também não se observou melhora clínica após o tratamento, sugerindo-se que os efeitos da terapia celular devam ser avaliados a médio e longo prazo (Quimby et al., 2013). E Thomson et al. (2019), num estudo clínico (Fase 1) infundiram CEMs

autólogas em gatos via artéria renal, demonstrando ser uma possível via de administração, não observando-se qualquer efeito adverso em até três meses após o tratamento.

Na DRC, os estudos em animais de companhia são escassos. Não se tem informações sobre o uso das CEMs em cães com DRC, e seus possíveis efeitos na função renal e qualidade de vida.

Portanto, em função da ausência de estudos que comprovem a segurança da infusão intravenosa de CEMs alogênicas em cães com DRC, e visto que o potencial terapêutico dessas células pode trazer melhora de qualidade de vida desses pacientes, esse trabalho teve como objetivos avaliar a segurança dessa terapia celular bem como os seus efeitos na função renal desses pacientes acompanhados ao longo do tempo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais, aspectos éticos e delineamento do estudo

Trata-se de estudo clínico longitudinal prospectivo, realizado com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEUA/PUC-PR) registrado sob o número 01214/ 2017 (Anexo 1).

Foram selecionados cinco cães doentes renais crônicos oriundos da rotina clínica de um hospital veterinário particular da cidade de Curitiba, no período de agosto de 2018 a setembro de 2019, com doença em evolução natural; portanto, não tivemos um grupo homogêneo (Tabela 1). Foram diagnosticados como doentes renais crônicos por clínicos veterinários e então encaminhados para seleção de participação do estudo. Todos os pacientes foram estadiados baseando-se nas diretrizes propostas pela IRIS, não fizeram uso de quaisquer medicações e alimentação balanceada durante a vigência do estudo. Os tutores foram informados sobre a pesquisa e com a anuência de todos, os pacientes foram submetidos à terapia celular, concomitantemente com a terapêutica clínica previamente estabelecida pelos veterinários responsáveis pelos casos.

Tabela 1– Raça, idade e estágio IRIS dos cães com doença renal crônica tratados com células estromais mesenquimais alogênicas derivadas de tecido adiposo (Curitiba/PR, 2018-2019)

Cão	Raça	Descrição	Estágio IRIS*
1	Pinscher	16 anos MC	II
2	SRD	15 anos MC	I
3	SRD	8 anos MC	II
4	SRD	13 anos MC	II
5	Jack russel terrier	11 anos MC	II

SRD, sem raça definida; MC, macho castrado; IRIS, Sociedade Internacional de Interesse Renal;

*Estágio IRIS no momento da admissão para o estudo.

Os animais receberam três infusões de CEMs no dia 0, 21 e 42. As avaliações clínica e laboratorial foram realizadas no dia 0, 21, 42, 63 e 153.

2.2 Avaliação clínica

Na avaliação clínica, os tutores foram inqueridos a respeito da evolução clínica, uso de medicações, exposição a toxinas, apetite e tipo de alimentação, comportamento e frequência de micção, volume e cor da urina, quantidade e qualidade da água ingerida. No exame físico foram avaliados estado de consciência, peso, hidratação, coloração de mucosas, inspeção de linfonodos periféricos, frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e foi realizada a aferição da pressão arterial sistólica (PAS) por meio do aparelho Doppler, modelo 811 B (Parks medical, Oregon, USA).

2.3 Avaliação laboratorial

Para avaliação laboratorial foram colhidos 8,6 mililitros (mL) de sangue da veia jugular e distribuídos em três frascos. Três mL foram transferidos para tubo vacuntainer com EDTA, para realização do hemograma. Quatro mL em tubo a vácuo com ativador de coágulo (sílica) para análise de ureia, creatinina, fósforo e SDMA, enquanto 1,6 mL na seringa de gasometria sem agulha, contendo heparina de lítio balanceada com cálcio para análise de hemogasometria, sódio, potássio e cálcio iônico. Os exames foram realizados imediatamente após a coleta, no Laboratório de Análises Clínicas – Clinilab (Curitiba, Brasil).

Os exames bioquímicos foram realizados no equipamento Mindray BS-240 (Mindray Bio-medical electronics CO., LTD, Shenzhen, China), química líquida no kit bioquímico

Bioclin (Obelis S.A, Bruxelas, Bélgica). Sendo, a creatinina por método cinético colorimétrico kit Creatinina Cinética (Bioclin, Bruxelas, Bélgica), o fósforo por método UV de ponto final kit Fósforo UV de ponto final (Bioclin, Bruxelas, Bélgica), e a ureia por método de cinética de ponto fixo com o kit Ureia UV (Bioclin, Bruxelas, Bélgica).

O hemograma foi realizado no equipamento Mindray BC-2800 Vet (Shenzhen Mindray Bio-medical electronics CO., LTD, Shenzhen, China) com hematoscopia microscópica (Zeiss KF2 ICS, Gena, Alemanha), para contagem diferencial de células e análise morfológica.

O teste SDMA é um imunoenensaio de alto rendimento realizado com um analisador bioquímico de alta produtividade no laboratório da IDEXX em São Paulo, SP, Brasil. A hemogasometria venosa foi realizada em equipamento EDAN i15 VET (Shenzhen, Guangdong, China).

A coleta da urina foi feita por cistocentese ecoguiada, para evitar a adição de proteína ao trato urogenital, posicionando o animal em decúbito dorsal, localizando a vesícula urinária com o ultrassom para a realização da punção vesical com uma agulha de calibre 22 conectada a uma seringa de 10 mL (Chew, 2011). A análise da urina foi realizada avaliando-se o aspecto físico, químico e a análise do sedimento. A densidade urinária foi estimada por refratometria em refratômetro clínico (ATC, China), a análise química foi realizada por meio de tira reagente (Combur¹⁰ Test M, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha), e a avaliação do sedimento urinário foi realizado por microscopia óptica, em aumento 10 e 40X, com amostra a fresco.

O exame bioquímico de relação proteína/creatinina urinária (RPC_U) foi realizado com o sobrenadante da urina após a centrifugação, por método colorimétrico – vermelho de Pirogalol. A proteína foi mensurada com o kit BIOPROT U/LCR (Obelis S.A, Bruxelas, Bélgica) e a creatinina com o kit Creatinina Cinética (Bioclin, Bruxelas, Bélgica), ambos no equipamento BS-240 Mindray (Mindray Bio-medical electronics CO., LTD, Shenzhen, China).

2.4 Terapia celular

Os cães receberam três administrações de CEM alogênicas, sendo nos dias 0, 21 e 42. As células foram recebidas a partir do laboratório Bio Cell (Laboratório Bio Cell, de Brasília, Brasil), enviadas conservadas em botijão de nitrogênio, e com certificado do laboratório para a cultura e análises imunofenotípicas.

O tecido adiposo do subcutâneo foi coletado de três cães jovens e saudáveis. Para a coleta do tecido adiposo, os doadores foram submetidos a um protocolo anestésico e, em seguida, realizou-se uma incisão na região lombar e, aproximadamente, 20 gramas de tecido

adiposo foram retirados da base da cauda. O tecido adiposo foi lavado em solução salina 0,9% para remover resíduos sanguíneos, e transportado resfriado até o laboratório, onde passou pelo processo de digestão enzimática. Esse material foi submetido a um processo de filtração para iniciar uma seleção das CEMs. Posteriormente, as células foram colocadas em frascos de cultura com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich), e foram incubadas a 37,5 °C e 5% CO₂. O meio de cultura foi trocado uma vez a cada três dias, até as células atingirem 80% de confluência, quando a tripsinização foi realizada utilizando-se tripsina EDTA (Sigma-Aldrich) para retirar as células das garrafas e quantificá-las em câmara de Neubauer. Posteriormente elas foram envasadas em palhetas de 0,5 mL na concentração de 1 milhão de células por palheta para congelamento em nitrogênio líquido. O meio de congelamento utilizado foi a solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e soro fetal bovino (SFB). O procedimento de isolamento, cultivo e caracterização das CEMs foi realizado conforme descrito por Falcão et al. (2019).

Parte das CEMs do lote de células utilizadas no experimento foi descongelada e os testes para a presença de *Mycoplasma*, fungo e bactéria foram realizados pelo método de reação em cadeia da polimerase (VeritiThermalCycler – Thermo Fischer Scientific).

2.5 Controle de qualidade e caracterização das CEMs

2.5.1 Imunofenotipagem

As CEMs foram caracterizadas de acordo com o definido pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) por imunofenotipagem com os anticorpos CD29-RD1 de rato anti-humano (Beckman Counter, Fullerton, CA, USA), CD44-FITC de rato anti-equino (AbD Serotec, Raleigh, NC, USA), caprina anti-canina CD90 primária (Washington State University, Seattle, WA, USA) e IgM de rato conjugado anti-caprino AF594 secundário (Thermo Sci., Rockford, IL, USA). E ainda o marcador de superfície negativo CD34-FITC anti-humano de rato (Invitrogen). A função de pluripotência (marcadores intranucleares) SOX2 e OCT3/4 também foi analisada. Os marcadores foram avaliados pelo método de imunofenotipagem por citômetro de fluxo de Imagem Amnis®. Após essa caracterização, as células foram descongeladas e lavadas com PBS (Reprodux) para aplicação nos animais.

2.5.2 Teste do congelamento

Para realizar e avaliar a viabilidade das CEMs após o congelamento, um milhão de CEMs, de cada animal, foram descongeladas e duas garrafas de cultivo células foram abertas

com 200.000 células por garrafa de 25cm². Após 24 horas do descongelamento foi realizada a avaliação da capacidade de adesão ao plástico das células e a proporção de células mortas. Foi realizada a avaliação da multiplicação celular por microscopia óptica após 48 e 96 horas do congelamento.

2.5.3 Diferenciação celular

As CEMs dos 3 animais foram induzidas à diferenciação celular para tecido ósseo, tecido cartilaginoso e tecido adiposo, em triplicata. O ensaio de diferenciação foi realizado com passagem celular 4.

Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 12 poços. Após 3 dias, quando as células atingiram 80% de confluência, o meio de cultivo foi substituído por meio comercial de diferenciação (condrogênico, adipogênico e osteogênico) e a cultura permaneceu por 21 dias com alterações de meio a cada 2 dias. Para confirmar a diferenciação nos três tipos de tecido, as células foram fixadas durante 20 minutos à temperatura ambiente em paraformaldeído a 4% e coradas durante 5 min com Oil Red 1,25% para visualizar gotas lipídicas intracelulares (esperados após diferenciação adipogênica), Alizarin Red a 2% para visualizar depósitos de cálcio (esperados após diferenciação osteogênica) e de azul de Alcian 1% para visualizar as glicosaminoglicanas (esperadas após diferenciação condrogênica). As células coradas foram examinadas de forma qualitativa e documentadas sob microscopia de campo claro.

2.5.4 Esterilidade

Parte das CEMs do lote de células utilizadas no experimento foi descongelada e o teste de presença de *Mycoplasma*, Fungo e Bactéria foram realizados pelo método reação em cadeia da polimerase (VeritiThermalCycler – Thermo Fischer Scientific). Os testes foram realizados pelo laboratório VETDNA, localizado em Botucatu-SP e os primers utilizados foram desenvolvidos por eles.

2.5.5 Viabilidade Celular

Além disso, a viabilidade das células após o descongelamento foi avaliada por citometria de fluxo, no equipamento Amnis Imaging, com o kit de apoptose com anexina V Alexa Fluor™ 488 e iodeto de propídio (PI) (ThermoFischerScientific). A avaliação foi realizada 1 hora pós descongelamento.

Após a realização de todos os testes de controle de qualidade descritos acima, as CEMs congeladas foram enviadas para Curitiba, a fim da realização dos experimentos.

Foram mantidas em botijão de nitrogênio até os dias de administração. Nos dias de tratamento os materiais utilizados durante o procedimento do descongelamento foram posicionados em uma bancada e ficaram 30 minutos expostos à luz ultravioleta, enquanto tubos cônicos contendo meios de descongelamento, lavagem e transporte ficaram no banho maria a 37°C. Após os 30 minutos, a luz ultravioleta foi desligada e iniciado o processo de descongelamento. As palhetas foram retiradas do botijão de nitrogênio e colocadas em banho maria a 37°C, por 10-20 segundos. As CEMs foram depositadas no tubo com meio de descongelamento e centrifugadas por três minutos a 200 rpm. Após, foi realizado o descarte do sobrenadante e adicionado cinco mL do meio de lavagem. O processo de lavagem foi repetido três vezes, sendo três minutos de centrifugação a 200 rpm, e descartando o sobrenadante. Por fim, as CEMs foram colocadas em um meio de transporte e armazenadas em uma seringa, dentro de uma caixa de isopor até o momento da aplicação.

Todos os pacientes foram submetidos ao tratamento com CEMs alogênicas derivadas de tecido adiposo, pela infusão de $1 \times 10^6 \pm 10\%$ de células estromais mesenquimais alogênicas por Kg de peso vivo do animal. A infusão foi realizada via intravenosa pela veia cefálica, sendo as células diluídas em 50 mL de solução de ringer com lactato (Fresenius Kabi Brasil Ltda., Aquiraz, Brasil), em torno de 30 minutos. Os cães receberam três infusões de CEMs alogênicas, sendo no dia 0, e repetida nos dias 21 e 42, após serem selecionados.

Após o descongelamento, as CEMs utilizadas tiveram alíquotas separadas e foram analisadas para a viabilidade celular, no Núcleo de Tecnologia Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Anexos 2,3 e 4). Para a viabilidade celular foi utilizado o corante vital 7-AAD (BD Pharmingen, San Jose, USA), por 30 minutos, lavadas com PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, USA) e fixadas com PBS contendo 1% de paraformaldeído (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, USA) e analisadas no software FlowJo (FlowJo, Ashland, OR, EUA).

2.6 Análise estatística

Os dados clínicos e diagnósticos (paramétricos) coletados no estudo foram analisados quanto a normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965), sendo então descritos em média e desvio padrão (Anexo 5).

Para análise da resposta da infusão intravenosa de CEMs, foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas seguido do teste de Bonferroni. Os dados foram expostos em médias, observando-se o valor de F e considerando intervalo de confiança de 95%, nível de significância a 5% e valor de $p > 0,05$ (Anexos 6 e 7).

Utilizou-se o software STATA (versão 14, College Station, Texas, US) para as análises estatísticas.

3. RESULTADOS

A conservação das CEMs em nitrogênio líquido não afetou a viabilidade celular, visto que todas as três amostras avaliadas apresentaram viabilidade acima de 90%. (Tabela 2, Anexos 2, 3 e 4).

Tabela 2 – Amostras de células estromais mesenquimas derivadas de tecido adiposo utilizadas para tratamento de cães com doença renal crônica e avaliadas quanto a viabilidade celular (Curitiba/PR, 2019).

	7-AAD	Viabilidade
Amostra 1	8,31%	91,69%
Amostra 2	7,82%	92,18%
Amostra 3	6,65%	93,35%

Nenhum dos pacientes apresentaram qualquer efeito adverso como: vômito, diarreia, alteração respiratória, alteração da frequência cardíaca ou reação anafilática, durante e após uma hora de cada aplicação, bem como não foi observada nenhuma alteração como apatia ou inapetência após a infusão das CEMs.

Os resultados relacionados ao peso vivo, PAS, contagem total de eritrócitos e de leucócitos sanguíneos, creatinina, SDMA séricos, pH venoso, densidade urinária e RPC_u , de cada um dos cinco cães tratados, são demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados clínicos (peso e pressão arterial sistólica), hematológicos (eritrócitos e leucócitos), bioquímicos (creatinina, SDMA, pH venoso) e urinários (densidade urinária e RPC_u) de cães com doença renal crônica tratados com células estromais mesenquimais alogênicas derivadas do tecido adiposo (Curitiba/PR, 2019).

		Dias de Avaliação				
		0	21	42	63	153
Cão 1	Peso	3,8	3,8	3,8	3,7	3,8
	PAS	NR	170	160	131	115
	Eritrócitos	8,68	8,61	8,09	8,18	7,34
	Leucócitos	8,3	8,1	7,4	7,7	6,2
	Creatinina	2,1	2,1	2,2	2,3	2,6
	SDMA	35	35	37	44	39
	pH venoso	7,26	7,3	7,3	7,29	7,29
	Densidade urinária	1,018	1,018	1,018	1,016	1,015
	RPC_U	0,10	0,10	0,12	0,13	NR
Cão 2	Peso	9,3	9,2	9,2	9,2	9,2
	PAS	250	NR	180	NR	NR
	Eritrócitos	7,05	7,38	7,62	6,80	7,1
	Leucócitos	8,1	7,2	8,3	7,5	6,6
	Creatinina	1,2	1,4	1,5	1,6	1,6
	SDMA	17	17	20	18	27
	pH venoso	7,35	7,35	7,33	7,34	7,3
	Densidade urinária	1,015	1,018	1,016	1,020	1,016
	RPC_U	NR	NR	0,40	NR	0,50
Cão 3	Peso	20,5	20,9	20,5	20,4	20,4
	PAS	125	NR	180	NR	NR
	Eritrócitos	8,46	8,29	8,50	7,87	8,07
	Leucócitos	8,1	6,8	6,3	7,6	6,6
	Creatinina	2,1	1,8	1,8	1,7	2,0
	SDMA	44	19	21	20	15
	pH venoso	7,43	7,38	7,38	7,34	7,3
	Densidade urinária	1,006	1,015	1,016	1,014	1,016
	RPC_U	NR	0,09	0,71	0,13	0,51
Cão 4	Peso	6,0	6,3	6,2	6,6	6,6
	PAS	120	NR	116	NR	NR
	Eritrócitos	8,82	7,39	7,53	7,97	6,95
	Leucócitos	9,2	8,8	9,5	10,8	8,1
	Creatinina	1,8	1,9	1,8	2,0	1,7
	SDMA	20	15	16	17	22
	pH venoso	7,38	7,38	7,38	7,39	7,4
	Densidade urinária	1,030	1,028	1,026	1,022	1,030
	RPC_U	NR	NR	0,62	NR	0,49
Cão 5	Peso	7,8	7,9	7,9	7,9	7,9
	PAS	210	130	130	NR	NR
	Eritrócitos	5,12	5,7	5,36	4,9	5,01
	Leucócitos	8,8	7,5	7,8	7,1	6,5
	Creatinina	3,5	2,1	2,7	3,1	2,4
	SDMA	19	27	20	28	33
	pH venoso	7,36	7,31	7,35	7,36	7,41
	Densidade urinária	1,020	1,018	1,020	1,020	1,018
	RPC_U	NR	NR	1,1	0,72	0,87

Peso – Kg; PAS – pressão arterial sistólica, mmHg; Eritrócitos – milhões/mm³; Leucócitos – mil/mm³; Creatinina – mg/dL; SDMA - dimetilarginina simétrica, mg/dL; RPC_U - razão proteína/ creatinina urinária; NR – não realizado.

Foi observada a manutenção da maioria dos parâmetros, como demonstrado na Tabela 3. Um animal apresentou queda da taxa de creatinina, 3,5 para 2,4 do dia 0 pra o dia 153 e em dois animais as taxas permaneceram estáveis. A maioria dos cães mantiveram a massa corporal ao longo do período avaliado, e um cão ganhou 600 gr de massa corporal.

Cilindrúria foi observada em um paciente (cão 4), o qual, no início do estudo, apresentava de quatro a seis cilindros hialinos e um a dois cilindros granulosos, por campo. Durante o tratamento foi observado uma redução na observação de cilindros e, no dia 63 em diante, sua ausência.

Considerando o grupo dos cinco animais tratados não foi observado diferença estatística dos parâmetros de eritrócitos, creatinina, uréia, SDMA, sódio, potássio, cálcio, fósforo e densidade urinária ao longo do tempo de estudo ($p>0,05$). Os valores de média e desvio padrão se mantiveram similares e sobrepostos, como mostra o Anexo 5. Particularidades relacionadas a cada um dos animais tratados e informações relatadas pelos tutores estão relatadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Sinais clínicos e comportamento (de acordo com os tutores) de cães com doença renal crônica, antes e após o tratamento com células estromais mesenquimais alogênicas derivadas do tecido adiposo.

Animal	Sinais clínicos antes do tratamento	Sinais clínicos depois do tratamento	Comportamento antes do tratamento	Comportamento depois do tratamento
1	Vômitos esporádicos, fezes pastosas, hiporexia, hipertensão	Ausência de vômito, fezes normais, normorexia, normotensão, +40 g PV	Apatia	↑ Atividade
2	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
3	Polidipsia e noctúria	↓ Ingestão de água, ↓ Frequência urinária, +350 g PV	Sem alteração	↑ Atividade
4	Sem alteração	+50 g PV	Sem alteração	Sem alteração
5	Sem alteração	+350 g PV	Apatia	↑ Atividade

PV - peso vivo, g – gramas, ↑- aumentou, ↓- diminuiu, + - ganho

4. DISCUSSÃO

O presente estudo teve, como principal objetivo, avaliar a segurança da administração de células estromais alogênicas em cães com DRC, já que isso ainda não havia sido demonstrado nessa espécie, nesta condição clínica; e, em segundo plano, seus efeitos. Observou-se que a infusão alôgenica de CEMs não apresentou quaisquer efeitos adversos durante, e nem imediatamente após as infusões, bem como durante o período de acompanhamento de 120 dias após a mesma.

Optou-se pelo uso de CEMs alogênicas entendendo-se que, por se tratar de pacientes doentes renais crônicos, submetê-los a procedimentos anestésico e cirúrgico para a coleta do seu próprio tecido adiposo poderia significar risco importante de piora do quadro clínico bastante delicado. A opção foi de se ter CEMs para pronto uso, para infusão por via intravenosa, por ser um procedimento mais simples e representar menor risco de complicações aos pacientes com DRC. Contudo, a segurança em relação a essa terapêutica ainda não havia sido devidamente demonstrada em cães com DRC, somente em gatos. Até o momento do presente estudo, não encontramos pesquisas realizadas com o uso terapêutico de células estromais mesenquimais em cães com DRC.

O número de cinco animais investigados no presente estudo, acompanhados pelo período de 120 dias após o tratamento, nos permitiu uma boa avaliação da segurança do tratamento com CEMs alogênicas derivadas do tecido adiposo. Contudo, entendemos que, para a avaliação dos efeitos terapêuticos em cães com DRC, foram utilizados os marcadores de rotina clínica, mas notou-se que estes são limitados para comprovar a ação benéfica. Seriam necessários testes fora da rotina clínica, como: biópsia renal com avaliação histopatológica, avaliação de interleucina, ou seria necessário avaliar um número maior de pacientes.

Assim, a avaliação estatística dos achados clínicos e dos biomarcadores de função e lesão renal, não apresentou diferença entre os momentos de avaliação, mas acredita-se que algumas das observações identificadas tenham relevância clínica e, portanto, merecem ser enfatizadas e discutidas a fim de poderem servir a novos estudos.

Os cães que apresentavam sinais clínicos de DRC no início do tratamento, tiveram melhora desses sinais. Cães com DRC sob tratamento convencional, podem apresentar melhora clínica, mas muitas vezes a medicação tem que ser mantida (Roudebush et al, 2010). Portanto, sugere-se que resultados de melhora clínica nos animais investigados no

presente estudo sejam por participação das CEMs no controle da doença e conferindo melhora de qualidade de vida aos mesmos.

Nesse sentido, no nosso estudo houve a manutenção ou o ganho de massa corporal nos cães tratados com CEMs, evidenciando um resultado importante benéfico do tratamento com CEMs nos cães com DRC, já que normalmente ocorre perda de peso com a progressão da doença. A perda de peso pode ser causada por inúmeros fatores que decorrem da inflamação, tais como o aumento do catabolismo proteico; a excreção aumentada de bicarbonato leva à acidose metabólica, a qual estimula nos músculos a degradação das células musculares e perda da massa magra. Além disso, as citocinas IL-6 e TNF-alfa também agem comprometendo o apetite, levando à uma redução espontânea da alimentação (Costa de Oliveira et al., 2010).

A perda de massa corporal é um fator de risco, que aumenta as taxas de morbidade e de mortalidade em pessoas e cães com doenças crônicas (Freeman, 2012; Ineson et al., 2019). Provavelmente, em nosso estudo, a ação anti-inflamatória das CEMs possa ter sido o mecanismo de melhora e manutenção do peso nos cães com DRC tratados no nosso estudo, e certamente merece novos estudos, para o entendimento dos mecanismos envolvidos, já que isso pode influenciar na taxa de sobrevivência.

Adicionalmente, os cães que após a infusão das CEMs se apresentaram mais ativos, segundo seus tutores, nos leva a pensar que, por serem animais idosos e que podem apresentar outras comorbidades, tais como doenças articulares, podem se beneficiar do tratamento realizado. As CEMs podem ter migrado para outros focos inflamatórios, tais como as articulações, e com isso resultando em melhora na disposição e atividade, mas com esse possível controle do foco inflamatório das articulações, o rim conseqüentemente também está sendo beneficiado. Este fator é conhecido como *homing*, que é a capacidade das células-tronco de encontrar seu destino em um órgão-alvo através da corrente sanguínea, onde direciona a migração de células-tronco através de diferentes vias de sinalização, mediadas por citocinas ou receptores de fator de crescimento liberados na superfície das células-tronco. As citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento e enzimas liberadas de um tecido ou órgão específico se ligam aos receptores correspondentes expressos nas células-tronco e direcionam as células-tronco para um alvo específico (Tao et al., 2018).

Os exames hematológicos não sofreram alterações dignas de nota. O número de leucócitos se manteve estável durante o período do estudo, podendo sugerir mais uma

evidência, nesse estudo de segurança do tratamento, pela ausência de algum tipo de resposta inflamatória adversa decorrente das CEMs alogênicas.

Quanto aos biomarcadores, em relação a creatinina, utilizada para avaliar a função renal, observamos que não houve aumento nos cães tratados, e ainda houve a diminuição dela em dois cães. Isso pode indicar um efeito benéfico das CEMs, no controle do quadro clínico ou mesmo na melhora dele, o que exigiria um novo estudo com maior número de animais para a confirmação. A redução nos valores da creatinina sérica em pacientes com DRC estágios II e III foi observada em gatos, aos sete dias e, de forma mais pronunciada, 60 dias após a infusão de CEMs alogênicas derivadas de membrana amniótica (Vidane et al., 2016), evidenciando efeito renoprotetor da terapia celular na DRC.

A resolução quanto a cilindrúria de um dos cães investigados, ao final do tratamento, sugere uma melhora na proteção do epitélio tubular. Cilindros são formados nos túbulos distais por consequência de alta acidez, alta concentração de solutos e baixa velocidade do fluxo neste segmento do néfron (Chew, 2011). Não temos o conhecimento de efeitos das CEMs relacionados à formação de cilindros na doença renal, demonstrado em animais domésticos, mas atenuaram marcadores de lesão renal e dano oxidativo, protegendo o epitélio tubular da lesão de reperfusão, inibindo a apoptose na região lesada e aumentando a proliferação de células sobreviventes, em um estudo realizado em ratos (Zhuo et al., 2013).

Tivemos algumas outras limitações nesse estudo. Uma delas foi em relação a avaliação da RPC_u , pois este teste só era realizado se houvesse presença de proteinúria semiquantitativa. A RPC_u nos ajudaria a estabelecer um prognóstico, porque a proteinúria persistente está associada ao risco da morbidade e mortalidade urêmica, e sugerimos que seja incluída de forma consistente nos próximos estudos. Com relação a PAS, não foram aferidas em todas as etapas, pois alguns pacientes estavam muito estressados no momento do exame clínico. Contudo, dois pacientes evidenciaram redução da PAS durante o tratamento, e, para esses temos duas hipóteses, a que eles já haviam se ambientado ao ambulatório, equipe e tratamento, ou, que realmente possa ter sido mais um efeito benéfico das CEMs. Adicionalmente, sugere-se que os próximos estudos incluam a avaliação da taxa de filtração glomerular e a análise de citocinas urinárias. O baixo número de animais nos surpreendeu, visto que se esperava poder contar com maior número de casos, a fim de melhor responder às perguntas do estudo, contudo a adesão

por parte dos proprietários foi baixa, mostrando o que pode ser inerente ao estudo que conta com casuística e adesão de veterinários e tutores.

Concluimos que, nosso estudo sugeriu a segurança da terapia celular com CEMs alogênicas derivadas de tecido adiposo, em cães com DRC, acrescentando-se a efeitos positivos que devem ser mais bem investigados. Assim, mostra-se que a terapia com infusão intravenosa de CEMs alogênicas é promissora para o evitar a progressão da DRC em cães com DRC no estágio II, sugerindo-se novos estudos com maior número de pacientes e avaliações que permitam identificar os mecanismos de ação das células.

REFERÊNCIAS

Chew, D. J., DiBartola S. P., Schenck P. A. (2011). Urologia e nefrologia do cão e gato. 2nd ed, Elsevier editora. pp 5-7.

International Renal Interest Society (2019)

http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf [accessed 02 October 2019]

Falcão, M., Brunel, H., Peixer, M., *et al* (2019). Effect of allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) on corneal wound healing in dogs. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*.

Freeman, L.M. (2012). Cachexia and sarcopenia: emerging syndromes of importance in dogs and cats. *Journal Veterinary Internal Medicine*. 26(1), 3-17.

Ineson, D.L., Freeman L.M., Rush J.E. Clinical and laboratory findings and survival time associated with cardiac cachexia in dogs with congestive heart failure (2019). *Journal Veterinary Internal Medicine*. 33(5),1902-1908.

Oliveira, C.M., Kubrusly, M., Mota, R.S, *et al* (2010). Malnutrition in chronic kidney failure: what is the best diagnostic method to assess? *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 32(1), 55-68.

Quimby, J. M., Webb, T. L., Gibbons, D. S., & Dow, S. W. (2011). Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: A pilot study. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 13, 418–426.

Quimby, J. M., Webb, T. L., Habenicht, L. M., & Dow, S. W. (2013). 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*. 4, 48.

Roudebush, P., Polzin, D.J., Adams, L.G., Towell, T.L., & Forrester, S.D. (2010). An evidence-based review of therapies for canine chronic kidney disease. *Journal of Small Animal Practice*. 51(5), 244-252.

Tao, Z., Tan, S., Chen, W. *et al*. (2018) Stem Cell Homing: a Potential Therapeutic Strategy Unproven for Treatment of Myocardial Injury. *Journal of Cardiovascular Translation Research*. 11, 403–411.

Thomson, A. L., Berent, A. C., Weisse, C., & Langston C.E. (2019). Intra- arterial renal infusion of autologous mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: Phase I clinical trial. *Journal Veterinary Internal Medicine*. 33(3), 1353-1361.

- Vidane, A.S., Pinheiro, A.O., Casals, J.B., *et al* (2016). Transplantation of amniotic membrane-derived multipotent, cell ameliorates and delays the progression of chronic kidney disease in cats. *Reproduction in Domestic Animals*. 51, 1-11.
- Villanueva, S., González, F., Lorca, E., *et al* (2019). Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for treating chronic kidney disease: A pilot study assessing safety and clinical feasibility. *Kidney Research Clinical Practice*. 38(2), 176-185.
- Yun, C. W., & Lee, S. H. (2019). Potential and Therapeutic Efficacy of Cell-based Therapy Using Mesenchymal Stem Cells for Acute/chronic Kidney Disease. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1619.
- Zhuo, W., Liao, L., Fu, Y., *et al* (2013). Efficiency of Endovenous Versus Arterial Administration of Mesenchymal Stem Cells for Ischemia-Reperfusion–Induced Renal Dysfunction in Rats. *Transplantation Proceedings*. 45, 503-10.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos em nosso estudo que o uso de CEMs alogênicas, derivadas do tecido adiposo, sugere ser segura em cães com DRC, pois os cães não apresentaram nenhum efeito colateral durante, imediatamente após, ou após 120 dias a infusão intravenosa. Embora, não tenha sido observado diferença significativa nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e urinários, por termos um número limitado de cães, foi possível observar que alguns cães tiveram alterações clínicas como: melhora do apetite, manutenção e até ganho de peso e permaneceram mais ativo, sugerindo uma eficácia preditiva renoprotetora. Por termos uma melhora clínica de alguns cães, sugerimos um estudo com maior número de pacientes e por mais tempo, pois o controle da reação inflamatória, como fator de progressão espontânea da DRC, pode ser promissor para a melhora da qualidade e da expectativa de vida nos pacientes DRC.

ANEXOS



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 16 de novembro de 2017.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01214 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: *TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM DOENÇA RENAL CRÔNICAS EM CÃES*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

PEDRO VICENTE MICHELOTTO JUNIOR

EQUIPE DE PESQUISA

Michelle Millstedt, Patrícia F. Malard

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO

Escola de Ciências da Vida

VIGÊNCIA DO PROJETO	Março/2018 a Julho/2019	QUANTIDADE DE ANIMAIS	24
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Canis lupus familiaris</i>	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Independente	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	Variados	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Hospital Veterinário Clinivet	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização.

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).



ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
NÚCLEO DE TECNOLOGIA CELULAR

VIABILIDADE CELULAR
TÉCNICA: CITOMETRIA DE FLUXO

Curitiba, 08 de outubro de 2018.

IDENTIFICAÇÃO: Cão 2

FONTE: Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

RESULTADO: 7AAD – 8,31% Viabilidade – 91,69%

ALEXANDRA CRISTINA SENEGAGLIA – Ph.D. LIDIANE MARIA BOLDRINI LEITE – Bióloga
CRBio: 09678-07 CPF: 899.298.619-04 CRBio: 108397/07-D CPF: 035.233.019-80

- Em concordância com critérios pré-estabelecidos pelo Núcleo de Tecnologia Celular da PUCR células com viabilidade celular acima de 70% são consideradas elegíveis para infusão nos pacientes.
- 7AAD (7-Aminoactinomycin D): células com a membrana celular comprometida (mortas) são permeáveis e ficam coradas com o corante fluorescente enquanto que as células vivas (com a membrana intacta) não absorvem o corante.
- Anexina V: é uma proteína de ligação para fosfolípidos que na presença de íons de cálcio exibe alta afinidade para ligação seletiva a fosfatidilserina. A presença da fosfatidilserina na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorre nas células em apoptose (morte celular programada).

Rua Imaculada Conceição, 1155. Prado Velho. Curitiba-PR
CEP: 80215-901 CNPJ: 76659820/0001-51
Fone: (41) 3271-1858 Fax: (41) 3271-2646

Anexo 2 – Avaliação da viabilidade celular através de citometria de fluxo do cão 04.004.16 (cão 2).



ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
NÚCLEO DE TECNOLOGIA CELULAR

VIABILIDADE CELULAR
TÉCNICA: CITOMETRIA DE FLUXO

Curitiba, 08 de outubro de 2018.

IDENTIFICAÇÃO: Cão 5

FONTE: Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

RESULTADO: 7AAD – 7,82% Viabilidade – 92,18%

ALEXANDRA CRISTINA SENEGAGLIA – Ph.D. LIDIANE MARIA BOLDRINI LEITE – Bióloga
CRBio: 09678-07 CPF: 899.298.619-04 CRBio: 108397/07-D CPF: 035.233.019-80

- Em concordância com critérios pré-estabelecidos pelo Núcleo de Tecnologia Celular da PUCR células com viabilidade celular acima de 70% são consideradas elegíveis para infusão nos pacientes.
- 7AAD (7-Aminoactinomycin D): células com a membrana celular comprometida (mortas) são permeáveis e ficam coradas com o corante fluorescente enquanto que as células vivas (com a membrana intacta) não absorvem o corante.
- Anexina V: é uma proteína de ligação para fosfolípidos que na presença de íons de cálcio exibe alta afinidade para ligação seletiva a fosfatidilserina. A presença da fosfatidilserina na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorre nas células em apoptose (morte celular programada).

Rua Imaculada Conceição, 1155. Prado Velho. Curitiba-PR
CEP: 80215-901 CNPJ: 76659820/0001-51
Fone: (41) 3271-1858 Fax: (41) 3271-2646

Anexo 3 - Avaliação da viabilidade celular através de citometria de fluxo do cão 04.005.16 (cão 5).



ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
NÚCLEO DE TECNOLOGIA CELULAR

VIABILIDADE CELULAR
TÉCNICA: CITOMETRIA DE FLUXO

Curitiba, 08 de outubro de 2018.

IDENTIFICAÇÃO: Cão 6

FONTE: Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

RESULTADO: 7AAD – 6,65% Viabilidade – 93,35%

ALEXANDRA CRISTINA SENEGAGLIA – Ph.D. LIDIANE MARIA BOLDRINI LEITE – Bióloga
CRBio: 09678-07 CPF: 899.298.619-04 CRBio: 108397/07-D CPF: 035.233.019-80

- Em concordância com critérios pré-estabelecidos pelo Núcleo de Tecnologia Celular da PUCR células com viabilidade celular acima de 70% são consideradas elegíveis para infusão nos pacientes.
- 7AAD (7-Aminoactinomycin D): células com a membrana celular comprometida (mortas) são permeáveis e ficam coradas com o corante fluorescente enquanto que as células vivas (com a membrana intacta) não absorvem o corante.
- Anexina V: é uma proteína de ligação para fosfolípidos que na presença de íons de cálcio exibe alta afinidade para ligação seletiva a fosfatidilserina. A presença da fosfatidilserina na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorre nas células em apoptose (morte celular programada).

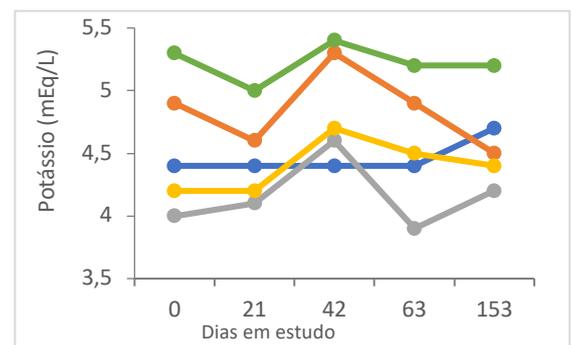
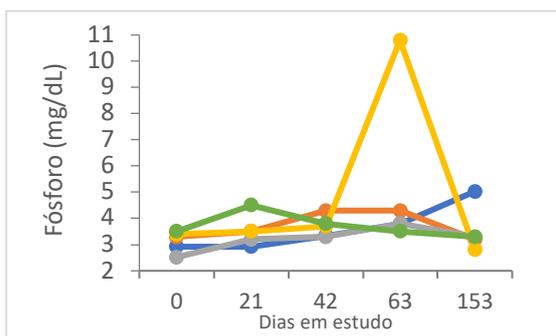
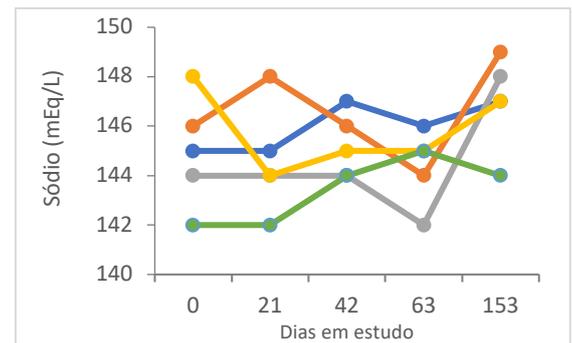
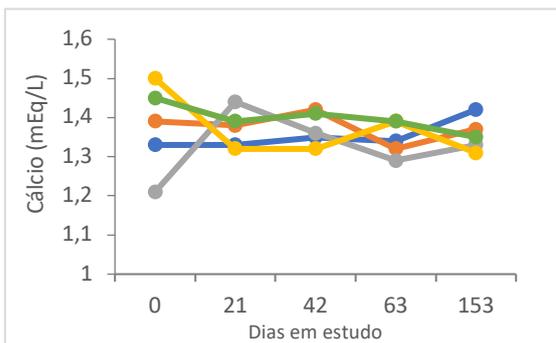
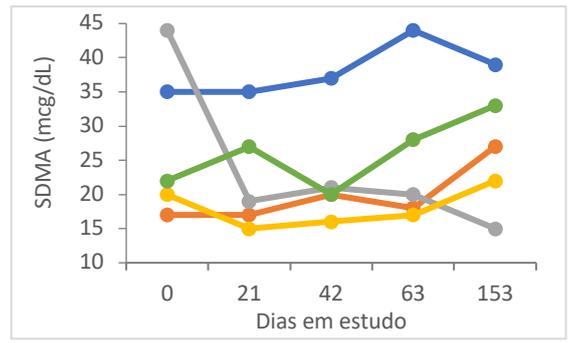
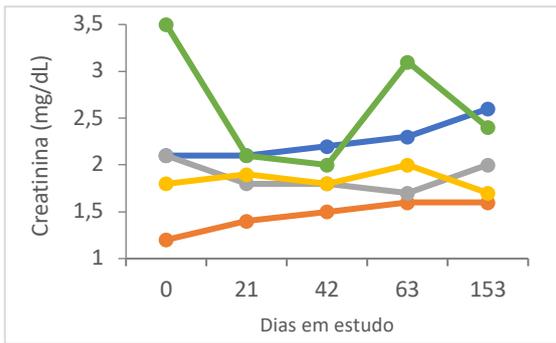
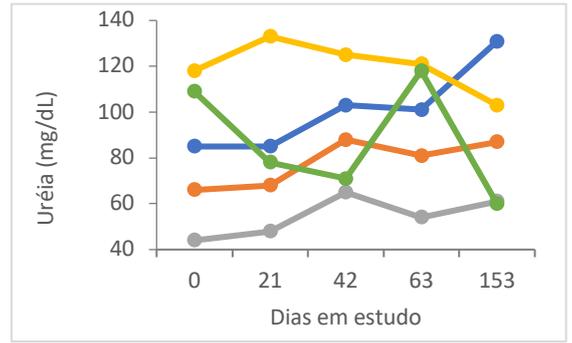
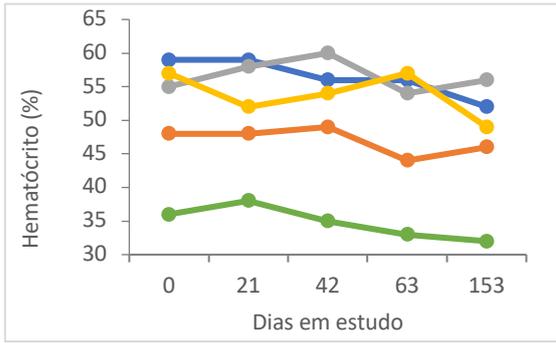
Rua Imaculada Conceição, 1155. Prado Velho. Curitiba-PR
CEP: 80215-901 CNPJ: 76659820/0001-51
Fone: (41) 3271-1858 Fax: (41) 3271-2646

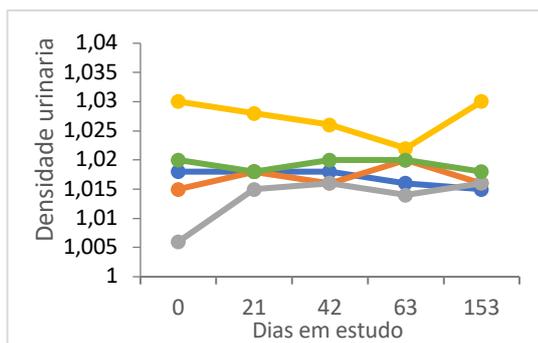
Anexo 4 - Avaliação da viabilidade celular através de citometria de fluxo do cão 04.008.16 (cão 6).

PARÂMETROS	DIA 0	21 DIAS	42 DIAS	63 DIAS	153 DIAS
Hemograma					
Eritrócitos (milhões/mm ³)	7,6 ± 1,6	7,5 ± 1,1	7,4 ± 1,22	7,1 ± 1,4	6,9 ± 1,0
Hematócrito (%)	51 ± 9,35	51 ± 8,5	50,8 ± 9,7	48,8 ± 10,2	47 ± 8,2
Leucócitos (mil/mm ³)	8,5 ± 0,5	7,7 ± 0,8	7,9 ± 1,2	8,1 ± 1,5	6,8 ± 0,7
Plaquetas (mil/mm ³)	356,4 ± 71	419 ± 105,6	283,2 ± 84,5	339 ± 61,6	338,4 ± 82,7
Proteína total (g/dL)	7,2 ± 0,7	7,3 ± 0,8	7,6 ± 0,7	7,3 ± 0,72	7,3 ± 0,7
Bioquímico sérico					
Ureia (mg/dL)	84,4 ± 30,4	82,4 ± 31,5	90,4 ± 24,4	95 ± 27,9	88,4 ± 26,7
Creatinina (mg/dL)	2,1 ± 0,8	1,9 ± 0,3	1,9 ± 0,3	2,1 ± 0,6	2,1 ± 0,4
SDMA (mcg/dL)	27,6 ± 11,5	22,6 ± 8,29	22,8 ± 8,17	25,4 ± 11,3	27,2 ± 8,35
Hemogasometria					
pH	7,4 ± 0,06	7,3 ± 0,05	7,3 ± 0,03	7,4 ± 0,06	7,4 ± 0,05
pCO ₂ (mm/Hg)	37 ± 5,2	36,5 ± 6,2	34,7 ± 3,7	33 ± 5,7	34,1 ± 7,3
HCO ₃ (mEq/L)	20,2 ± 1,05	19,3 ± 0,9	19 ± 1,2	19 ± 2,8	19,8 ± 2,4
BE	-4,6 ± 2,3	-6,2 ± 1,8	-6,0 ± 1,1	-6,1 ± 3,42	-5,6 ± 2,5
Sódio (mEq/L)	145 ± 2,24	144,6 ± 2,2	145,2 ± 1,3	144,4 ± 1,52	147 ± 1,7
Potássio (mEq/L)	4,6 ± 0,53	4,5 ± 0,4	4,9 ± 0,44	4,6 ± 0,5	4,6 ± 0,3
Calcio iônico (mEq/L)	1,4 ± 0,11	1,4 ± 0,05	1,4 ± 0,04	1,3 ± 0,04	1,4 ± 0,04
Fósforo (mg/dL)	3,2 ± 0,4	3,5 ± 0,6	3,7 ± 0,4	5,2 ± 3,1	3,5 ± 0,8
Urinálise					
Densidade urinaria	1,02 ± 0,01	1,019 ± 0,005	1,019 ± 0,004	1,018 ± 0,003	1,019 ± 0,006
pH	5,6 ± 0,9	5,8 ± 0,4	5,8 ± 0,4	5,8 ± 0,4	5,9 ± 1,1
Glicose	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cilindros	Hialino (1 cão)	Hialino (1 cão)	Hialino (1 cão)	Negativo	Negativo
RPC _U	0,1-1,3 (2 cães)	0,7 (3 cães)	0,8 ± 0,4	0,8 (3 cães)	0,5 (3 cães)

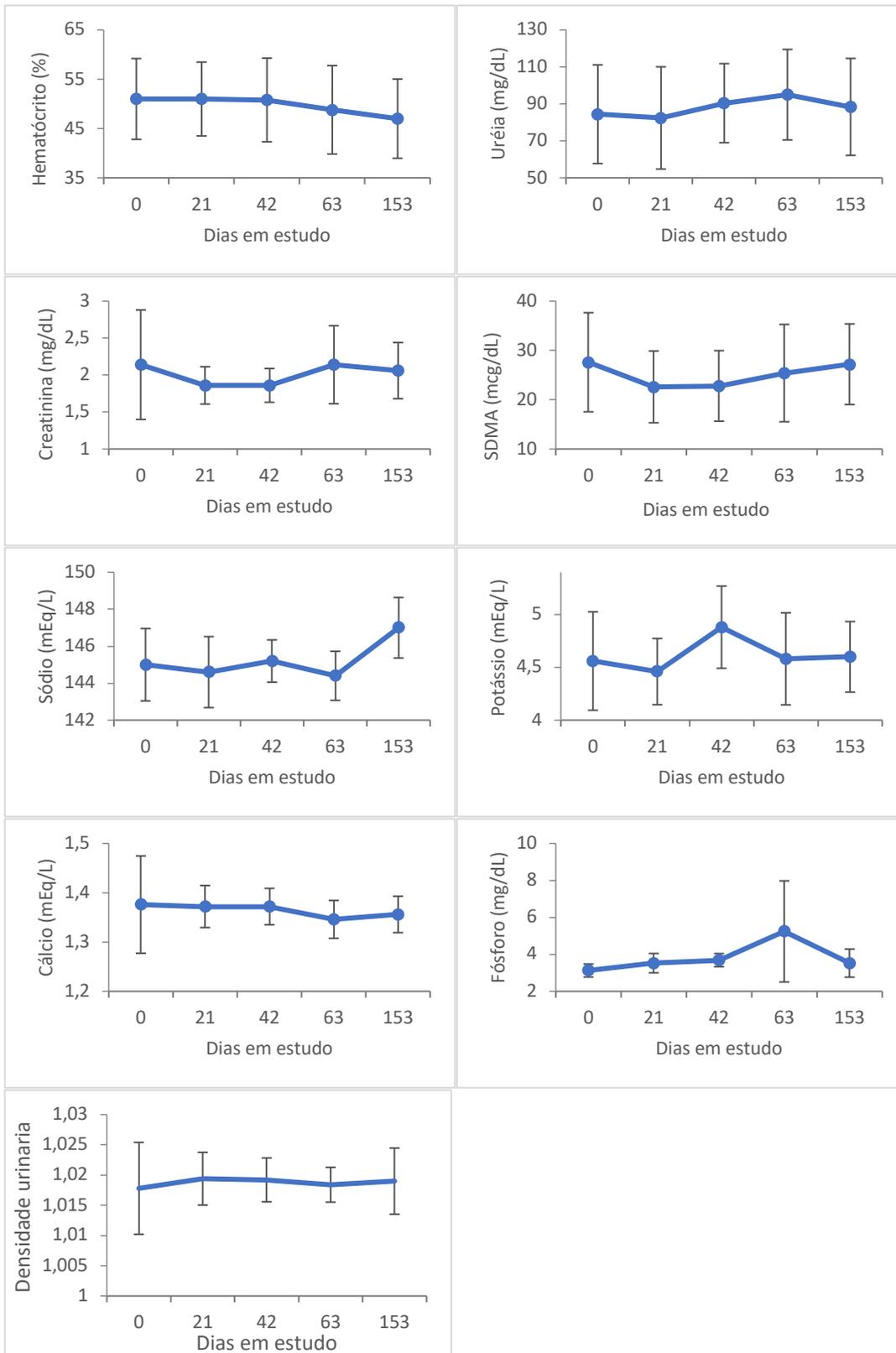
RPC_U – relação proteína creatina urinária

Anexo 5 - Sumarização (média, desvio padrão) dos dados laboratoriais de cães submetidos a aplicação intravenosa de células mesenquimais





Anexo 6 - Parâmetros sanguíneos e urinário individuais de cada cão doente renal crônico, tratado ao longo dos 5 meses com células estromais mesenquimais por via intravenosa. Cão 1 – azul, cão 2 – laranja, cão 3 – cinza, cão 4 – amarelo, cão 5 – verde.



Anexo 7 - Valores médios e respectivos intervalos de confiança de parâmetros sanguíneos em cães doentes renais crônicos, ao longo dos 5 meses de tratamento com células estromais mesenquimais por via intravenosa.