

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ALOTRANSPLANTE PARCIAL DE VESÍCULA  
URINÁRIA COM CÉLULAS MESENQUIMAIS  
ESTROMAIS MULTIPOTENTES ALOGÊNICAS  
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM COELHOS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**ALOTRANSPLANTE PARCIAL DE VESÍCULA URINÁRIA  
COM CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS  
MULTIPOTENTES ALOGÊNICAS DERIVADAS DO TECIDO  
ADIPOSO EM COELHOS**

**Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, área de Concentração em Cirurgia Veterinária, da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para  
obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária.**

**Orientador: Prof. Dr. Ney Luis Pippi**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pinto Filho, Saulo Tadeu Lemos  
Alotransplante parcial de vesícula urinária com células mesenquimais estromais multipotentes alogênicas derivadas do tecido adiposo em coelhos / Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho.-2014.  
75 p.; 30cm

Orientador: Ney Luis Pippi  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2014

1. Cirurgia 2. Bexiga 3. CTM 4. Enxerto I. Pippi, Ney Luis II. Título.

---

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: saulovet2011@hotmail.com

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

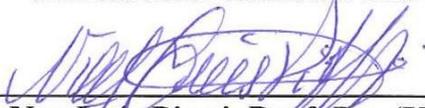
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**ALOTRANSPLANTE PARCIAL DE VESÍCULA URINÁRIA COM  
CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS MULTIPOTENTES  
ALOGÊNICAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM COELHOS**

elaborada por  
**Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho**

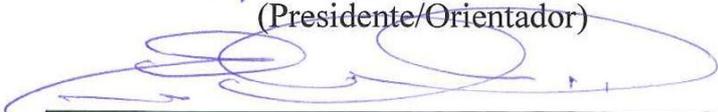
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA**



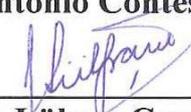
---

**Ney Luis Pippi, Prof. Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



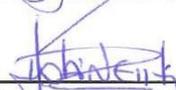
---

**Emerson Antonio Contesini, Prof. Dr. (UFRGS)**



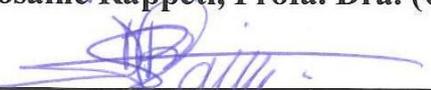
---

**Dominguita Lühers Graça, Profa. Dra. (UFSM)**



---

**Josaine Rappeti, Profa. Dra. (UFPEL)**



---

**Daniel Roulim Stainki, Prof. Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 15 de dezembro de 2014.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço à Deus, por propiciar a realização de mais esta etapa profissional, sempre apontando os melhores caminhos.

Agradeço também a minha mãe, Enar Mussoi, que, além de ter me dado a vida, sempre me incentivou nesta caminhada dando prova mais uma vez do seu amor incondicional. Aproveito para agradecer também aos meus irmãos e cunhados que estavam sempre torcendo pelas minhas conquistas vibrando a cada vitória.

À minha esposa, companheira e colega de trabalho, Fabíola Dalmolin, que participou e participará dos bons e maus momentos em que todos passam durante a vida. Com certeza, foram mais bons do que maus e agora que chegamos juntos ao final desta etapa, partiremos em busca de novas conquistas. Boa sorte pra nós! TE AMO Fabi!

Ao professor e orientador Ney Luis Pippi que, muito mais que um mestre, é um grande amigo, mostrando sempre quais os melhores caminhos aos seus orientados. Gostaria apenas de registrar o quanto tento seguir o exemplo deste professor para guiar a minha caminhada como docente. Sei que nunca chegarei perto do que ele é e sempre será para a medicina veterinária do nosso país. Levo também como exemplo seu amor e dedicação para com sua família. Não poderia deixar de agradecer também a minha eterna professora, mestre, paraninfa e patologista Dominguita Graça, pelos conselhos e ajuda na parte histológica.

Ao professor e grande amigo Mauricio Veloso Brun, meu co-orientador que, como nos tempos de mestrado, me acolheu na sua equipe, nos mostrando os caminhos para as boas publicações e nos ensinando a sua maior especialidade: a videocirurgia. Muito obrigado meu irmão pelos momentos de alegria e aprendizado proporcionados por ti (Lu e Quiba) durante esta etapa da minha caminhada. Não poderia deixar de agradecer também ao professor Alexandre Krause pelos “ensinamentos celulares”, que muitas vezes eu não entendia, devido a complexidade do assunto. Ao mestre Alceu Gaspar Raiser, aceitando em me co-orientar e sempre disposto a ajudar quando necessário.

Ao “Quarteto Fantástico”, formado pelo Jaime, Maurício e Tiagão (ou Tiaguinho se preferir), além de mim. Os três primeiros são merecedores da fama, pois se dedicaram bem mais do que eu, principalmente no meu primeiro ano de doutorado, por ter outros compromissos. À estes colegas e amigos, o meu “muito obrigado”, de coração, por todos os momentos em que passamos juntos tentando elevar o mais alto possível o nome do laboratório de células-tronco. Vocês sabem que dá muito trabalho, mas valeu a pena!

Aos estagiários Bianca Eidt e Gabriel Damiano pela ajuda no experimento, seja nas cirurgias ou cuidando dos meus coelhos. Agradeço de maneira especial ao Matheus Pippi da Rosa pela grande amizade, além da ajuda, cultivando as minhas células no Biorep, quando nossa estufa de cultura estava quebrada, e agora, auxiliando na parte final com a citometria celular. Muito obrigado parceiro! Que possas colher em breve o que está plantando agora.

Aproveito para agradecer a equipe do Biorep nas pessoas do Werner, Juliana, Janduí, Vitor e claro, o chefe de todos, o prof. Bayard, pois, graças a ele a equipe pode me auxiliar prontamente. Nesse momento agradeço a Michele, pós-doc da USP, que apareceu nos momentos finais, mas que sempre disponível, realizou a citometria e imunocitoquímica das células, as quais vão nos permitir publicar os trabalhos em revistas de melhor qualidade.

Aos demais colegas da pós-graduação, especialmente aqueles que trabalharam no desenvolvimento do projeto, sempre prontos a ajudar nas horas mais difíceis. À prof. Carmem Godoy, residentes Kamila e Aline do diagnóstico por imagem, que fizeram os US das coelhas antes e após as cirurgias. A equipe do LACVET e LABIOX: Profs. Cinthia Melazzo, Sônia Lopes, as residentes Renata e Diandra, as pós-graduandas Cibele e Fátima.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, programa de excelência com conceito 7 na avaliação da CAPES e a Maria, séria e competente secretária do Programa, sempre disposta a ajudar no que fosse possível.

A Nelci e a Mairi, pela ajuda nas cirurgias e pelas conversas no bloco cinco, durante a execução do experimento.

Ao professor Marcelo da Veiga, mestranda Marina Vencato e ao acadêmico Lucas Borges pelas análises histológicas e o livre trânsito no Laboratório de Histologia (LABITEX) para esclarecimento das dúvidas. A prof. Ivana e seus alunos: Tális, Alencar e Francine pelas análises laboratoriais.

Ao professor Marcos Braz Vaz pela análise estatística dos artigos e compreensão em me ensinar, o que para ele, é o básico da estatística.

Ao Bob e Magoô, meus companheiros pets, sempre a esperar em casa para oferecer amor incondicional. A minha eterna Magoô, estará sempre no meu coração!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela viabilização da bolsa, que me proporcionou dedicação exclusiva as atividades do doutorado.

Por fim, mas não menos importante, as minhas queridas coelhas que participaram sem vontade própria do meu experimento, o meu mais profundo agradecimento. Ao coelho doador do tecido adiposo, peço perdão de coração. Todos permanecerão para sempre na minha lembrança com os votos de que nada disso tenha sido em vão!

## RESUMO

Tese de doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ALOTRANSPLANTE PARCIAL DE VESÍCULA URINÁRIA COM CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS MULTIPOTENTES ALOGÊNICAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM COELHOS**

AUTOR: SAULO TADEU LEMOS PINTO FILHO

ORIENTADOR: NEY LUIS PIPPI

Data e local da defesa: Santa Maria, 15 de dezembro de 2014.

O estudo foi dividido em três artigos, sendo que os dois últimos fizeram parte do mesmo experimento, o qual foi dividido para melhor explicação e detalhamento dos procedimentos realizados e parâmetros avaliados. O primeiro teve como objetivo trazer as características e os usos atuais das células-tronco mesenquimais (CTMs) adultas derivadas da medula óssea, do tecido adiposo e polpa dentária, bem como os protocolos laboratoriais e experimentos *in vivo* desenvolvidos no Laboratório de Cirurgia experimental da Universidade Federal de Santa Maria, visando a aplicação destas células em pacientes animais. O segundo teve como objetivo caracterizar os cálculos e a urinálise de coelhos domésticos submetidos ao alotransplante de vesícula urinária. Para isso foram utilizados 25 coelhos Nova Zelândia Branco, os quais foram submetidos a alotransplante parcial de bexiga, sendo tratados com ciclosporina (GCi) ou células-tronco mesenquimais (GCe). Neste estudo, 58,3% (7/12) dos animais do GCi apresentaram cálculos vesicais, porém, apenas 33,3% (4/12) dos coelhos do GCe apresentaram urolitíase vesical. Concluiu-se que houve menor número (33,3%) de animais com cálculo vesical no grupo tratado com ADSCs, sendo cálcio o mineral mais prevalente em ambos os grupos. A urinálise revelou que os animais tratados com CTM não demonstraram hematúria e/ou bacteriúria. O terceiro artigo objetivou avaliar clínica, ecográfica e anatomofisiologicamente o alotransplante parcial de bexiga a fresco em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), utilizando como agente imunomodulador CTMs alogênicas derivadas do tecido adiposo. Utilizou-se 25 coelhos, sendo um deles macho e doador das CTMs, e os outros 24 fêmeas, submetidas a alotransplante parcial de bexiga, sendo tratadas com ciclosporina (GCi) ou células-tronco mesenquimais (GCe). Os tratamentos utilizados na pesquisa alcançaram resultados clínicos satisfatórios, impedindo a rejeição do aloenxerto. Todos os animais tiveram recuperação satisfatória, não apresentando nenhuma alteração clínica ou comportamental em decorrência do tratamento durante todo o período de avaliação pós-cirúrgica. Conclui-se que as CTMs derivadas do tecido adiposo (ADSCs), em única aplicação, foram suficientes para evitar sinais clínicos e ecográficos de rejeição ao aloimplante de vesícula urinária, mantendo a estrutura anatomofisiológica vesical por 30 dias em coelhos.

**Palavras-chave:** Cirurgia. Bexiga. CTM. Enxerto.

## **ABSTRACT**

Doctorate Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ALLOTRANSPLANTATION WITH PARTIAL GALL URINARY ALLOGENIC MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL ADIPOSE DERIVED TISSUE IN RABBITS**

AUTHOR: SAULO TADEU LEMOS PINTO FILHO  
ADVISOR: NEY LUIS PIPPI  
Date and place of defense: Santa Maria, December 15th, 2014.

The study was divided in three articles. The last two were part of the same experiment, which was divided for better explanation and details of the procedures performed and parameters evaluated. The first described the features and current uses of adult MSCs derived from the bone marrow, adipose tissue and dental pulp, as well as laboratory protocols and *in vivo* experiments developed in the Laboratory of Experimental Surgery of the Federal University of Santa Maria aiming at application of these cells in veterinary patients. The second aimed to characterize the stones and urinalysis of domestic rabbits underwent allograft urinary bladder. For this 25 New Zealand White rabbits, which underwent partial allograft bladder, being treated with cyclosporine (GCi) or mesenchymal stem cells (GCe). In this study, 58.3% (7/12) of animals GCi had bladder stones, however, only 33.3% (4/12) rabbits GCe showed bladder urolithiasis. It was concluded that there were fewer animals (33.3%) with bladder calculus in the group treated with MSCs, calcium being the most prevalent mineral in both groups. Urinalysis showed that MSC-treated animals showed no hematuria and / or bacteriuria. The third article aimed to evaluate clinical, sonographic and anatomophysiological partial bladder fresh allograft in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), using as immunomodulator allogeneic MSCs derived from adipose tissue. We used 25 rabbits, one being male and the donor of MSCs, and the other 24 females who underwent partial allograft bladder, being treated with cyclosporine (GCi) or mesenchymal stem cells (GCe). The treatments used in the study reached satisfactory clinical results, preventing allograft rejection. All animals had satisfactory recovery, showing no clinical or behavioral change as a result of treatment throughout the period of post-surgical evaluation. It is concluded that ADSCs, in a single application, were sufficient to prevent clinical and ultrasound signs of rejection from allograft of the urinary bladder, which maintained the anatomophysiological structure for 30 days in rabbits.

**Keywords:** Surgery. Bladder. MSC. Graft.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

#### Artigo I

- Figura 1** Cultura de MSCs adultas derivadas do tecido adiposo de coelhos. (A) células ao 5º dia de cultura e (B) células no 12º dia de cultura. Observar a característica fibroblastóide das MSCs. (Aumento de 50X)..... **20**
- Figura 2** Digestão enzimática do tecido adiposo de coelhos. Tubo de polipropileno contendo fragmentos do tecido adiposo e colagenase tipo II antes (A) e após a digestão a 37°C pela colagenase tipo II apresentando aspecto leitoso (B)..... **26**

#### Artigo II

- Figura 1** Imagem da bexiga da coelha 1 (GCi) demonstrando a presença de cálculo (C). Observar a aderência do cálculo a mucosa do implante (D)..... **45**

#### Artigo III

- Figura 1** Alotransplante vesical em coelhos. Colocação dos três pontos de reparo para facilitar manipulação e sutura vesicais (A) e aspecto da bexiga após sutura do implante (B). Imagem ultrassonográfica vesical da coelha 17 (GCe) antes do transplante (C) e após o mesmo (D). Vesícula urinária preenchida por conteúdo heterogêneo, de moderada celularidade, parede de espessura normal e regular..... **62**

### CAPÍTULO 3

- Figura 1** Demonstração dos valores pré (PO) e pós-operatórios (15d e 30d) de ALT, AST, FA e Ureia, com os desvios-padrão e valores de p ( $p < 0,05$ ) em coelhas Nova Zelândia submetidas a alotransplante parcial de vesícula urinária..... **67**

<b>Figura 2</b> – CTMs derivadas do tecido adiposo de coelhos. Observar morfologia fibroblastóide aos 10 dias de cultivo (A). Seleção por tamanho e granulosidade celular (B). Observar homogeneidade da amostra em relação a estas características.....	<b>69</b>
<b>Figura 3</b> – Citometria de fluxo das CTMs derivadas do tecido adiposo de coelhos. Observar positividade para os CDs 73, 90 e 105 e negatividade para o CD45.....	<b>71</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

#### Artigo II

<b>Tabela 1</b> Caracterização (composição) dos cálculos vesicais de coelhos que apresentaram a alteração após alotransplante parcial de vesícula urinária.....	<b>44</b>
<b>Tabela 2</b> Características da urinálise dos coelhos que apresentaram cálculos vesicais após alotransplante parcial de vesícula urinária.....	<b>44</b>

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>07</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>08</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>09</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Artigo I - Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Artigo II - Caracterização de cálculos vesicais e urinálise em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) submetidos a alotransplante parcial de vesícula urinária e tratados com células-tronco mesenquimais alogênicas derivadas do tecido adiposo (ADSCs).....</b>	<b>32</b>
<b>2.3 Artigo III - Avaliações clínica, ultrassonográfica e anatomofisiológica do alotransplante parcial de vesícula urinária com células-tronco mesenquimais alogênicas derivadas do tecido adiposo em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).....</b>	<b>46</b>
<b>3 DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A segunda metade do século XX foi marcada por fantásticos progressos na área médica, particularmente com relação a novos métodos diagnósticos e novas modalidades terapêuticas. Dentre os numerosos avanços terapêuticos testemunhados, um dos mais notáveis foi o progresso na área de transplante de órgãos e, em particular, o emprego de células-tronco para a regeneração do sistema hematopoiético. Tendo como base experimentos utilizando modelos animais, as experiências clínicas iniciais com a restauração da hematopoiese através da infusão de células-tronco hematopoiéticas conduziram ao emprego já bem estabelecido de transplante de medula óssea no tratamento de várias doenças hematológicas benignas e malignas, bem como para alguns tumores sólidos. O reconhecimento do impacto desta nova modalidade terapêutica culminou com a concessão do Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1990 a Joseph Murray e E Donall Thomas, pioneiros em transplante de órgãos e células (MOTA et al., 2005).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) foram isoladas inicialmente em 1976, como células da medula óssea com capacidade de formar unidades de colônia semelhantes a fibroblastos *in vitro* (CFU-F). Em 1991, Caplan definiu o termo CTM como uma célula capaz de dar origem a outras linhagens de células diferentes da sua origem. Em 2005, padronizando a nomenclatura, o Comitê de Células-tronco Mesenquimais e dos Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) definiu as características das CTMs como: CTMs devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em cultura; CTMs devem expressar CD105, CD73 e CD90, e não expressar os marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 $\alpha$  ou CD19 e HLA-DR; CTMs devem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (SEMEDO et al., 2009).

As CTMs são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas, estando presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo na medula óssea (MO), no tecido adiposo, no periósteo, no tecido muscular e nos órgãos parenquimatosos. A MO constitui um dos principais sítios doadores dessas células, assim como de células-tronco hematopoiéticas e endoteliais. As CTMs caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras. Tais características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pelo *turnover* e pela manutenção de

todos os tecidos do organismo. Elas tornaram-se foco de numerosas pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular (MONTEIRO et al., 2010).

As CTMs possuem propriedades imunomoduladoras e imunossupressoras, as quais estão envolvidas nas imunidades inata e adaptativa. Este efeito imunossupressor é principalmente devido à secreção de fatores solúveis e pelo contato direto das CTMs com células do sistema imunológico, sendo que as CTMs assumem as propriedades imunossupressoras após exposição a um ambiente inflamatório. Algumas citocinas, tais como o TNF- $\alpha$ , a IL-1- $\beta$  ou o IFN- $\gamma$  são capazes de ativar as CTMs. Elas parecem ser pouco imunogênicas, devido à fraca expressão de MHC e mecanismos de coestimulação de células T (CD80, CD86, CD40). Esses recursos ajudam a prevenir a rejeição rápida e sensibilização imunológica (PERS; JORGENSEN, 2013).

O tecido adiposo representa fonte abundante de células para transplantes autólogos, além de ser facilmente obtido por lipoaspiração, que é um método mais barato e menos invasivo do que a punção da medula óssea. Ainda não há, entretanto, um consenso entre os pesquisadores quanto a nomenclatura e a plasticidade das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs). Apesar da carência de estudos clínicos, o número das ADSCs parece não se alterar, quanto à região anatômica. Entretanto, nos humanos, o tecido adiposo apresenta diferenças de metabolismo, conforme a localização anatômica. Além disso, outro fator que pode interferir na composição celular é a idade, pois se observou que os indivíduos mais jovens apresentam maior número de ADSCs em comparação com os mais idosos. Em camundongos, pesquisadores observaram diferenças em relação a composição celular e a capacidade de diferenciação das ADSCs, de acordo com as regiões anatômicas (YARAK; OKAMOTO, 2010).

O número de transplantes de órgãos e tecidos em humanos e animais tem crescido significativamente nos últimos anos, principalmente após o advento de técnicas modernas e mais seguras para a imunossupressão. O aprimoramento das técnicas operatórias proporcionou aos pacientes transplantados uma qualidade de vida aceitável e sobrevida mais longa. Apesar disto, ainda existem órgãos e tecidos que necessitam de pesquisas para a sua utilização na rotina dos transplantes. Embora a bexiga seja essencial para a manutenção da qualidade de vida dos animais e seres humanos, até o momento não se tem comprovação da viabilidade dos transplantes deste órgão (TEIXEIRA, 2007).

Segundo Brandt et al. (2004), os problemas relacionados ao armazenamento vesical são muitos e relevantes. Eles, além de influírem de forma efetiva na qualidade de vida, podem

eventualmente evoluir para falência renal. Atualmente, mudanças importantes nas práticas de promoção à saúde estão aumentando a longevidade e por consequência fazendo com que as pessoas fiquem mais vulneráveis aos diversos tipos de câncer. Com o avanço da tecnologia, os diferentes tipos de transplante têm sido amplamente aceitos e efetuados no mundo todo, inclusive para a reconstituição de órgãos retirados em parte ou no todo quando tomados por determinados tipos de câncer. Contudo, mesmo com as mais diversas indicações para reconstrução vesical, ainda são poucos os relatos de transplante de bexiga (BRANDT, 2004; TEIXEIRA et al., 2007).

Portanto, pretende-se com este trabalho avaliar a viabilidade do alotransplante parcial de bexiga a fresco em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), utilizando ADSCs de coelhos, cultivadas em laboratório, como agente imunossupressor.

## 2 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados desta tese estão sob a forma de três artigos científicos. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se nos artigos.

### 2.1 Artigo I

#### CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS: CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS

Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho<sup>1\*</sup>

Tiago Luis Eilers Treichel<sup>1</sup>

Jaime Sardá Aramburú Junior<sup>1</sup>

Mauricio Borges da Rosa<sup>1</sup>

Fabíola Dalmolin<sup>1</sup>

Maurício Veloso Brun<sup>2</sup>

Alexandre Krause<sup>2</sup>

Ney Luis Pippi<sup>3</sup>

Artigo publicado no periódico *Revista Veterinária e Zootecnia*, Botucatu, n.20 (Edição Comemorativa), p.49-59, 2013.

**RESUMO:** As células-tronco mesenquimais (CTMs) adultas são células-tronco somáticas presentes em pequenas quantidades em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, incluindo a medula óssea (MO), o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos. Por ser o tecido mais utilizado e caracterizado para o estudo das propriedades das células-tronco e por ter sido o primeiro empregado em terapia celular, a medula óssea é um dos principais tecidos para a obtenção de CTMs. Estudos contemporâneos vêm sendo realizados, descrevendo a utilização alógena e autógena das MSC para a reparação

---

<sup>1</sup>Médico Veterinário, aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Rua João Batista da Cruz Jobim, 115/203, Bairro Medianeira, CEP 97060-330, Santa Maria, RS, Brasil. Fone: 5599954161 E-Mail: saulovet2011@hotmail.com. \*Autor para correspondência.

<sup>2</sup>Médico Veterinário, Doutor, Professor do Departamento de Clínica de Pequenos Animais (DCPA) e PPGMV da UFSM.

<sup>3</sup> Médico Veterinário, PhD, Professor do DCPA e PPGMV da UFSM.

de diversos tecidos. Além da terapia celular em animais domésticos, sua importância em Medicina Veterinária deve-se também à geração de modelos experimentais aplicáveis a paciente humanos. A presente revisão objetivou trazer as características e os usos atuais das MSCs adultas derivadas da MO, do tecido adiposo e polpa dentária, bem como os protocolos laboratoriais e experimentos *in vivo* desenvolvidos no Laboratório de Cirurgia Experimental da UFSM visando a aplicação destas células em pacientes animais e a pesquisa translacional.

**Palavras-chave:** células multipotentes, cães, humanos, terapia celular.

### **ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS: CHARACTERISTICS AND EXPERIMENTAL USE IN ANIMALS**

**ABSTRACT:** The MSCs are defined as a subpopulation of somatic stem cells which are present in small amounts in perivascular regions of virtually all adult tissues, including bone marrow (BM), adipose tissue, periosteum, muscle and parenchymatous organs. Because BM is the most used and characterized tissue to define stem cells properties the and for being the first in cell therapy, BM is one of the main sources for MSCs. Contemporary studies have been performed, describing the use of autologous and allogeneic MSC for tissue repair in different organs. In addition to cell therapy in domestic animals its application in veterinary medicine also provides the generation of experimental models for human diseases. This review aims to bring the features and current uses of MSCs derived from adult bones tissue, adipose tissue and dental pulp, as well as laboratory protocols and *in vivo* experiments developed in Laboratory of Experimental Surgery UFSM aiming the application of these cells in animals patients and translational research.

**Keywords:** multipotent cells, dogs, human, cell therapy.

### **CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ADULTAS: CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

**RESUMEN:** Las células madre mesenquimales (MSC) son células madre adultas somáticas presentes en pequeñas cantidades en las regiones perivasculares de todos los tejidos adultos, incluyendo la médula ósea (MO), el tejido adiposo, el periostio, tejido muscular y los órganos parenquimatosos. Siendo el tejido más ampliamente utilizado y caracterizado para estudiar las propiedades de las células madre y se han utilizado por primera vez en la terapia celular, la médula ósea es un tejido principal para la obtención de MSCs. Los estudios contemporáneos

han llevado a cabo, que describe el uso de MSC alogénicas y autólogas para la reparación de diversos tejidos. Además de la terapia celular en los animales domésticos, su importancia en medicina veterinaria debe también para la generación de modelos experimentales aplicable a pacientes humanos. Esta revisión tiene como objetivo acercar a las características y usos actuales de las CMM derivadas de la masa ósea de los adultos, el tejido adiposo y la pulpa dental, así como los protocolos de laboratorio y experimentos in vivo desarrollados en el Laboratorio de Cirugía Experimental UFSM destinados a la aplicación de estas células en los pacientes animales y investigación traslacional.

**Palabras-clave:** Células multipotentes, perros, humanos, terapia celular.

## INTRODUÇÃO

As recentes descobertas sobre a biologia das células-tronco embrionárias (CTE) e somáticas (CTS), a descrição de novas fontes de células e a possibilidade de sua futura aplicação clínica tornam essas células uma promissora opção terapêutica para diversas enfermidades. O reconhecimento dessa importância culminou com a nomeação de dois pesquisadores, cujas descobertas revolucionaram a pesquisa em células-tronco, o prêmio Nobel em fisiologia e medicina de 2012 a Sir John B. Gurdon e Shinya Yamanaka. O Brasil possui legislação específica para a pesquisa e utilização terapêutica de células-tronco viabilizando estudos nesta área através de financiamento de projetos em institutos de terapia celular e centros de excelência (1).

O conceito de células-tronco surgiu a partir de experimentos pioneiros realizados no início dos anos 1960 por Ernest A. McCulloch e James E. Till que observaram a presença de colônias hematopoiéticas no baço de camundongos irradiados e que haviam recebido transplante de medula. Essas colônias eram derivadas de uma única célula, a célula-tronco (2). Outros estudos, realizados nas décadas de 1970 e 1980 pelo grupo de pesquisa de Alexander Friedenstein ampliaram o potencial de uso das MSCs, demonstrando sua capacidade de auto-renovação e diferenciação (3). Na época, devido à semelhança morfológica com fibroblastos em cultura, foram denominadas unidades formadoras de colônia fibroblástica (UFC-F) (4). Nas décadas seguintes, extensas pesquisas foram desenvolvidas para desvendar o potencial terapêutico das MSCs (3).

As CTMs são definidas como uma população de células-tronco somáticas presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea (MO), o tecido adiposo (TA), o periósteo, o tecido muscular e órgãos parenquimatosos. A MO constitui um dos principais sítios para a obtenção dessas células,

assim como de células-tronco hematopoiéticas e endoteliais (5). Embora as células-tronco embrionárias e as de pluripotência induzida sejam as de maior potencial de diferenciação, existem várias limitações à sua utilização devido a seu comportamento biológico, considerações éticas e manipulação genética (6).

A capacidade de dar origem a diferentes tecidos, entretanto, não está restrita apenas às células-tronco embrionárias. Células isoladas de tecidos adultos (mesenquimal, hematopoiético e nervoso) podem dar origem a vários tipos de tecidos, como o pancreático, o hepático, o cardíaco e o nervoso. Acredita-se que essas células desempenhem um importante papel na regeneração após injúria (7,1). Assim, o transplante de células-tronco adultas representa uma promissora terapia para doenças como cirrose hepática, o *diabetes mellitus*, a doença de Alzheimer, a insuficiência cardíaca e o infarto agudo do miocárdio (8). Nesse contexto, se tornaram foco de numerosas pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras (5).

A presente revisão objetivou trazer as características e os usos atuais das MSCs adultas derivadas da MO, do tecido adiposo e polpa dentária, bem como os protocolos laboratoriais e experimentos *in vivo* desenvolvidos em um laboratório de cirurgia experimental visando a aplicação destas células em pacientes animais e a pesquisa translacional.

#### *Características das MSCs*

Em cultura e condições adequadas de cultivo, as MSC exibem morfologia fibroblastoide (Figura 1) e são capazes de se diferenciar e dar origem a osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais e cardíacas, dentre outras (5,9). De acordo com resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa em CTMs, essas células devem apresentar o seguinte padrão fenotípico CD73+, CD90+, CD105+, CD45-, CD34-, CD14 ou CD11b-, CD79- ou CD19-, HLA-DR (10,11).

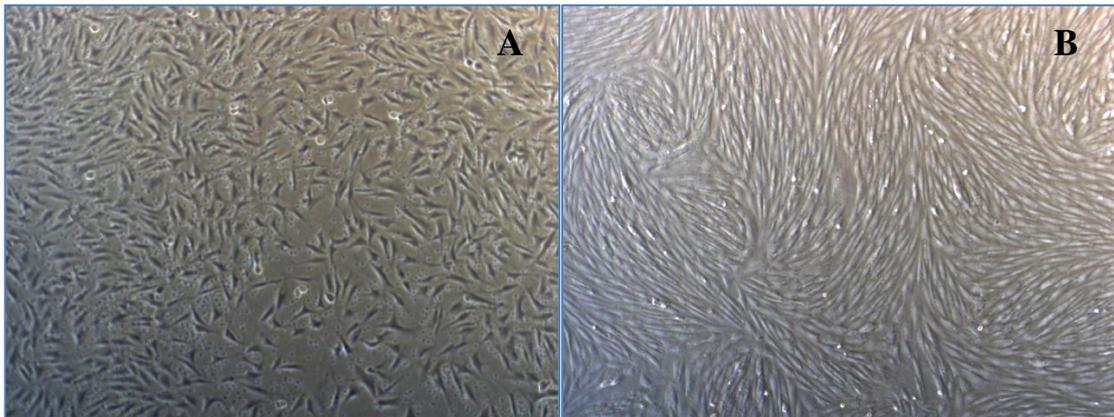


Figura 1- Cultura de MSCs adultas derivadas do tecido adiposo de coelhos. (A) células ao 5º dia de cultura e (B) células no 12º dia de cultura. Observar a característica fibroblastóide das MSCs. (Aumento de 50X)

As primeiras evidências do papel das MSCs sobre o sistema imune mostraram que a administração intravenosa delas em babuínos foi capaz de prolongar a sobrevivência de enxertos alogênicos de pele, de forma similar a potentes drogas imunossupressoras utilizadas rotineiramente na clínica (12). Além dos efeitos imunomoduladores, as MSCs expressam pequenas quantidades de complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I) e níveis negligenciáveis de MHC-II e/ou não expressão MHC-II em sua superfície. Durante o processo de seleção clonal positiva e negativa realizado pelas células de defesa do organismo (reconhecimento do próprio e do não-próprio) utiliza-se o MHC. Dessa forma, essas células seriam toleradas pelo organismo receptor. Também, o contato célula-célula faz com que as MSCs produzam diferentes tipos de fatores de crescimento solúveis, incluindo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), fator estimulador de crescimento de macrófago (M-CSF) e diversas interleucinas (IL-1,6,7,8,11,12,14,15), que influenciam fibroblastos e células granulocíticas envolvidas no processo de inflamação (5).

Foi observada ação imunomodulatória das CTMs *in vitro*, onde essas células alteraram o padrão de citocinas pelas células T *helper* e diminuição na liberação de mediadores como o fator de necrose tumoral (TNF) e interferon. Além disso, as MSCs inibem a proliferação de células T após estímulo por aloantígenos e agentes mitogênicos e impedem o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos. Essas ações poderiam interferir na modulação da inflamação, indução de tolerância, redução de complicações como a rejeição de alo-transplantes e a doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD) em humanos (13). *In vivo*, as MSCs prolongaram a sobrevivência de enxertos de pele e apresentaram vários efeitos imunomoduladores (14).

### 1. Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BMSCs)

Nas três últimas décadas as BMSCs têm sido alvo de importantes pesquisas científicas em função das suas relevantes propriedades para o uso na terapia celular. Por exemplo, a sua grande habilidade de diferenciação em osteoblastos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, levou a sua utilização clínica em estudos pilotos para distúrbios ósseos hereditários e deficiências osteogênicas. Já a habilidade dessas células em promover revascularização após injúria isquêmica levou à realização de estudos pré-clínicos em modelos animais de grande e pequeno porte com isquemia miocárdica (15).

Técnicas estudadas atualmente na engenharia de tecidos para a regeneração de bexiga constituem-se em promessa para a substituição parcial ou total do órgão em pacientes com bexiga neuropática, câncer, cistite intersticial, e outras doenças inflamatórias vesicais (16). Neste órgão, o interesse inicial centrou-se na regeneração dos tecidos, na esperança de permitir que a ampliação vesical autóloga contornasse os múltiplos problemas associados com a enterocistoplastia. No entanto, com maiores informações sobre a potencial diferenciação celular, a terapia genética bem sucedida e a progressão da imunomodulação, as possíveis aplicações das BMSCs para enfermidades da bexiga podem ser ampliadas. Estudos demonstram que estas células poderão provir o desenvolvimento de enxertos vesicais, podendo diferenciar-se em urotélio e músculo liso (3).

O potencial das BMSCs semeadas em arcabouço biodegradável foi avaliado na regeneração da bexiga em modelo canino, comparando com o músculo liso em relação à capacidade de crescimento e contratilidade vesicais. Os pesquisadores concluíram que o arcabouço semeado demonstrou aparência celular histologicamente semelhante à do órgão original, bem como a contratilidade do músculo liso, afirmando que as BMSCs podem servir como alternativa de fonte celular para a engenharia de tecidos urológicos (17).

Na odontologia, o uso destas células também é bastante promissor. Cientistas afirmaram que os fatores de crescimento e outras proteínas secretadas pelas BMSCs podem promover a regeneração do dente. O estudo combinou a utilização das BMSCs com as células do germe dentário (DBC) do segundo molar não erupcionado semeadas em arcabouço e autotransplantadas em suínos. Os autores demonstraram que as DBCs combinadas com as da medula óssea em arcabouço adequado podem regenerar dentes nesse modelo. Além disso, o mesmo estudo também indicou que o fluido da medula óssea, pode promover a regeneração dentária. No entanto, questões que envolvem a determinação de forma, controle de tamanho e erupção do dente precisam ser resolvidas. Conforme os autores, outros estudos deverão ser

realizados para aperfeiçoar a erupção dental, podendo fornecer um novo tratamento para perda de dentes no futuro (18).

## 2. Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs)

Em 2001 foi produzido um trabalho pioneiro, o qual afirmava conter MSC no lipoaspirado humano e que este poderia se tornar uma fonte alternativa às BMSCs (19). Foi relatado que, a partir daí, deu-se início a uma série de pesquisas, em que inúmeros autores conseguiram desenvolver várias linhagens celulares a partir de ADSCs humanas e de modelos experimentais animais. Segundo o autor, a grande vantagem era que a captação do tecido doador de CT não acarretaria morbidade relevante (4).

Atualmente, o interesse pelas ADSCs tem aumentado muito na medicina, principalmente em função da facilidade de obter grandes quantidades destas células através do processo de lipoaspiração, utilizando apenas anestesia local (11). Quando comparadas com as BMSCs, as ADSCs são igualmente capazes de se diferenciar em células e tecidos de origem mesodérmica. Como o tecido adiposo humano está presente em muitas regiões, é de fácil obtenção em grandes quantidades sob anestesia local com pouco desconforto para o paciente, podendo se configurar como fonte alternativa de células-tronco para a regeneração dos tecidos mesenquimais e engenharia de tecidos (6).

Foram citados usos das ADSCs em humanos para reconstrução de maxila, em fístulas associadas ou não à doença de Crohn, em escaras de decúbito e na esclerose múltipla, entre outras. Os autores afirmaram que os diversos ensaios clínicos demonstraram que este tipo de terapia está se tornando realidade. Surpreendentemente, resultados sugerem que a eficiência das ADSCs na medicina regenerativa pode estar relacionada mais a sua capacidade de modular a imunidade e/ou inflamação do que para seus potenciais de diferenciação. A relevância fisiológica deste fenômeno precisa ser melhor documentada, condição que poderia trazer ganhos de eficiência e, talvez, novas possibilidades terapêuticas para estas células (11).

Relacionado ao uso em pele, afirmou-se que a administração tópica de ADSCs pode acelerar o processo de cicatrização da ferida cutânea. No estudo do autor, úlceras cutâneas crônicas quimicamente induzidas foram cobertas com esponja de colágeno tipo I associada à ADSCs, o que aumentou a granulação tecidual e densidade capilar quando comparado com a utilização da esponja de colágeno isolada (6).

Também foi testado o uso das ADSCs para reconstrução de bexiga, induzindo estas a diferenciação *in vitro* em músculo liso vesical e semeando-as em arcabouço tridimensional com o objetivo de verificar se as células iriam continuar a diferenciação e crescimento

formando nova estrutura muscular vesical. Após a semeadura de 14 dias, o arcabouço cultivado foi implantado em fêmeas de ratas adultas atímicas, as quais haviam sofrido cistectomia com remoção de aproximadamente 50% da bexiga. O estudo concluiu que as ADSCs podem ser diferenciadas em músculo liso e semeadas em arcabouço vesical tridimensional, mantendo a expressão de marcadores moleculares de músculo liso. As ADSCs foram capazes de manter sua diferenciação em músculo liso e viabilidade *in vitro* e *in vivo* dentro da bexiga artificial. Os pesquisadores concluíram que a grande disponibilidade de ADSCs, combinado com a sua facilidade de obtenção e capacidade de se diferenciarem em músculo liso contrátil, faz da ADSC uma alternativa não-embrionária competitiva para a regeneração da bexiga e de outros tecidos que possuam músculo liso (20).

### 3. Células-tronco mesenquimais derivadas da polpa dentária (DPSCs)

Atualmente, as DPSCs estão sendo muito utilizadas na odontologia humana em função da facilidade de coleta, a qual está associada à baixa morbidade. A extração das células-tronco do tecido pulpar é altamente eficiente, já que as mesmas possuem alta capacidade de diferenciação e boa interatividade com biomateriais, tornando-as ideais para reconstrução tecidual. Quando comparadas às BSCs, as DPSCs demonstraram melhor habilidade para diferenciação em tecidos calcificados, embora em diferentes linhagens. Verificou-se que após serem semeadas em arcabouço de hidroxiapatita, apresentaram diferenciação odontoblástica em vez de osteoblástica como as BSCs (21).

Após estudos aprofundados de cultura, histoquímica, microscopia eletrônica, RT-PCR, imunohistoquímica e citometria de fluxo com DPSCs humanas, verificou-se que estas células possuem potencial proliferativo elevado, capacidade de auto-renovação e diferenciação em várias linhagens. Os autores afirmaram que estas células podem servir como modelo para o estudo da diferenciação de células-tronco adultas *in vitro* e regeneração de tecidos *in vivo* (22).

Com o objetivo de caracterizar as células-tronco isoladas da polpa dentária de dentes de cães (cDPSCs), a fim de definir ainda mais o cão como modelo animal para a endodontia regenerativa, pesquisadores isolaram CTMs de dentes pré-molares recém extraídos de Beagles de 10 meses de idade. As células isoladas foram investigadas para suas propriedades por meio de análise de suas características clonogênica e de seus crescimentos, pela expressão de marcadores de superfície e pela avaliação do seu potencial osteo/odontogênico, adipogênico e neurogênico. Os resultados deste estudo mostraram que as cDPSCs foram capazes de se diferenciar em linhagem odontoblástica funcional, com

potencial de mineralização ativa *in vitro*. No entanto, a diferenciação morfológica em odontoblastos, condição que é importante para a secreção de matriz dentinal uniforme, não foi evidente *in vitro*. Foi demonstrado que a dentina existente é necessária para guiar as células-tronco no espaço do canal e proporcionar a diferenciação em células odontoblásticas *in vivo*. Além disso, cDPSCs apresentaram superioridade na taxa de proliferação e diferenciação sobre as células-tronco mesenquimais derivadas da MO humana (hBMMSCs). No entanto, os potenciais de diferenciação neurogênica e adipogênica foram inferiores quando comparadas com as células-tronco da polpa dentária de dentes humanos (hDPSCs). Em geral, os dados apresentados neste estudo apoiam a utilização das cDPSCs na engenharia de tecidos dentários e, ainda, estabelecem o cão como modelo adequado na pesquisa odontológica (23).

Outros autores também afirmaram que a criopreservação destas células pode ser alternativa para a manutenção em laboratório. Foi observado que após longo prazo de preservação em temperaturas de  $-80^{\circ}\text{C}$ , osteoblastos diferenciados de DPSCs ainda são capazes de rapidamente reiniciar proliferação e produção de matriz mineralizada, de maneira semelhante a já demonstrada para células frescas. Além disso, a proliferação foi comparada à das células frescas, sem que ocorresse morte celular por apoptose (21).

### *Resultados de bancada*

Extensos protocolos já foram descritos para cultivo de células-tronco em vários animais, incluindo seres humanos (3).

A coleta de gordura para processamento das MSCs derivadas do tecido adiposo (ADSCs) em coelhos, pode ser realizada através de ressecção da bolsa adiposa interescapular ou por lipoaspiração. Em nosso laboratório é utilizada a técnica de ressecção da bolsa adiposa interescapular, sendo esta bastante eficiente para a obtenção de material suficiente para processamento e cultivo. São coletadas 10 gramas de tecido adiposo que, após processado, gera, em média,  $5 \times 10^6$  células, sendo estas após a quarta passagem (30 dias) aplicadas nos diferentes ensaios experimentais em animais. Em humanos, as pesquisas com isolamento das MSCs do tecido adiposo são mais comumente feitas com amostras obtidas de cirurgias de lipoaspiração. Nesse caso, esta é realizada de maneira seca, utilizando cânula reta de 20cm de comprimento, 3,5mm de diâmetro com três orifícios em linha e ponta romba (4).

A partir da obtenção da amostra, a individualização das células é obtida a partir de digestão enzimática com Colagenase tipo I, em agitação constante, a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. A solução é centrifugada para lavagem das células, que são colocadas em garrafas de cultivo celular, na concentração de  $10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Em uma variação de protocolo, a digestão é feita

em placa de Petri com uma solução de PBS e Colagenase tipo I a 0,075%. A amostra passa por repetidas centrifugações no processo de lavagem das células, que são colocadas nas garrafas de cultivo celular na concentração de 500mg de tecido adiposo/cm<sup>2</sup> (24). A lavagem das células é geralmente realizada com PBS (25,24,4). Em nosso laboratório utilizamos rotineiramente a solução de Hank's, sendo que não observamos diferença de eficiência quando utilizamos o PBS.

Torres (4), utilizando tecido adiposo de coelhos o tempo de digestão na colagenase foi de 60 minutos, enquanto Patricio (24), empregando tecido adiposo de cães, e Maciel (25), utilizando de gatos, foi de 30 minutos. O autor que utilizou tecido adiposo de coelhos não divulgou a viabilidade celular no seu trabalho, já os outros dois obtiveram 98% e 93%, respectivamente. No LATECER, o tempo utilizado para digestão por colagenase tipo II em tecido adiposo de cães e coelhos é de 25 minutos (Figura 2), já que a mesma é citotóxica e pode diminuir a viabilidade celular. No caso de células derivadas da polpa dentária de cães, o tempo deixado é de 60 minutos e a colagenase utilizada é a do tipo I. No caso da colagenase tipo II no tecido adiposo, é utilizada a proporção 1:3 (volume:volume) de tecido e enzima, já a do tipo I na polpa dentária é utilizada a proporção 1:5 (volume:volume). Logo após este tempo a neutralização é feita através da adição de meio de cultivo completo, em um volume de 1:1, obtendo-se, em média, 97% de viabilidade celular. Fadel (26), processando células derivadas do tecido adiposo de ovinos, utilizou protocolo de digestão enzimática com tripsina. Segundo o autor, o protocolo revelou quantidade de células esféricas, refringentes aderidas ao plástico da garrafa de cultura e após a primeira passagem as mesmas tornaram-se inviáveis. Para o meio de cultivo, a maioria dos autores utiliza Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbecco, com 10% de soro fetal bovino (SFB). No processamento de tecido adiposo de cão utilizou-se 15% de SFB na mistura (24). Em nosso laboratório também é utilizado o mesmo tipo de meio, com baixa glicose e 10% de SFB, porém, a fim de obter melhor adaptação das células ao cultivo utiliza-se meio contendo 20% de SFB para as primeiras passagens, sendo que, após a terceira passagem passa-se a utilizar 10% de SFB.

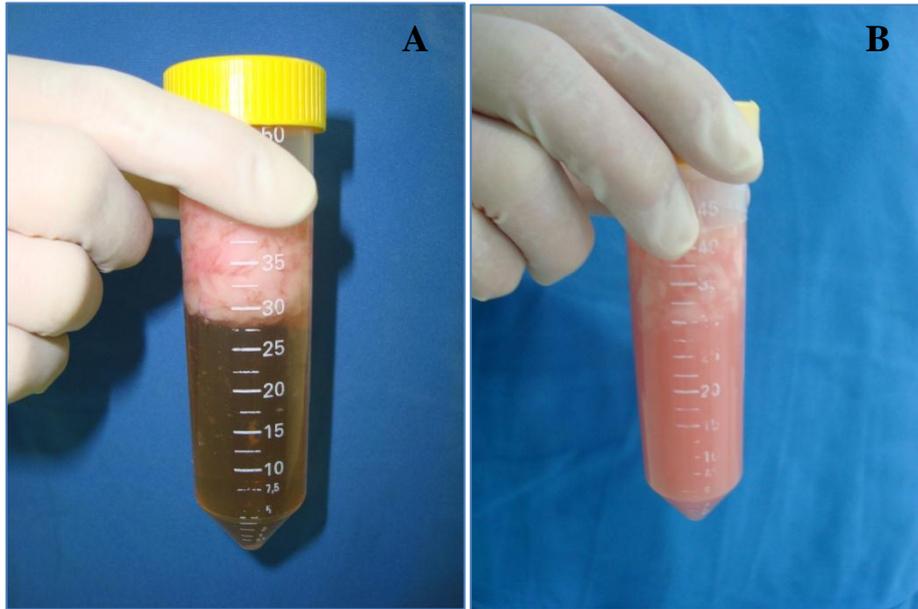


Figura 2 - Digestão enzimática do tecido adiposo de coelhos. Tubo de polipropileno contendo fragmentos do tecido adiposo e colagenase tipo II antes (A) e após a digestão a 37°C pela colagenase tipo II apresentando aspecto leitoso (B).

### *Resultados in vivo*

O número de pesquisas visando terapias reparativas utilizando células-tronco tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, no Brasil e no mundo. Os resultados já estabelecidos e as possibilidades de sucesso estão gerando grandes expectativas entre a comunidade científica e a população leiga (1,5). Diferentes pesquisas descrevem a utilização alógena e autógena das MSCs para a reparação de diversos tecidos. Importante campo de aplicação na Medicina Veterinária deve-se também à geração de modelos experimentais aplicáveis em pacientes humanos (5). As MSCs caninas, particularmente, também demonstraram potencial para uso em terapia celular, tanto em tecido ósseo como nos tecidos moles nesta espécie (9).

Por muitos anos, a MO foi considerada a principal fonte de células-tronco para aplicações na engenharia de tecidos (27). Estas células possuem muitas propriedades, as quais promovem considerável potencial de utilização na terapia celular para várias doenças (15,28). No entanto, um estudo em camundongos mostrou que as MSCs residem em praticamente todos os órgãos e tecidos, entre eles, cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, medula óssea, músculo, timo, pâncreas (29). Devido à facilidade de colheita e da abundância, as ADSCs tornam-se atrativas, sendo prontamente disponíveis no indivíduo adulto e cada vez mais populares para uso nos diversos sistemas orgânicos (27).

Nosso grupo objetivou avaliar a capacidade de regeneração do nervo tibial de coelhos Nova Zelândia, mediante a associação da terapia celular com técnica de tubulização por prótese de silicone. A partir dos resultados obtidos, observou-se a diminuição significativa da presença de degeneração walleriana nos animais tratados, sendo possível concluir que o tratamento com células-tronco mononucleares (CM) autólogas de medula óssea apresenta vantagens no processo de regeneração do nervo periférico sob a técnica de tubulização com 30 dias de pós-operatório (30). A associação de células mesenquimais provenientes da medula óssea de cães, associada à hidroxiapatita sintética (HA) favoreceu a regeneração óssea em defeitos realizados no osso alveolar da mandíbula de cães. Quando comparada ao uso somente da HA, esse processo de regeneração ocorreu de forma mais rápida em defeitos preenchidos com o biomaterial associado às CM (31). Oliveira et al. (32) avaliaram a utilização de CM da MO, associadas ou não com proteína morfogenética (rhBMP-2) na cicatrização de defeito ósseo experimental como alternativa aos métodos convencionais, analisando-se o tempo de evolução cicatricial e a presença dessas células no tecido neoformado. O estudo concluiu que a terapia celular utilizada, isoladamente ou associada à rhBMP-2, induz à cicatrização óssea mais rápida da tíbia em defeitos experimentais de cães. Treichel et al. (33) avaliaram o efeito do transplante de fração total de CM da MO ou FVE do tecido adiposo associado à membrana celulósica em ferida cutânea experimental de coelhos. Ao final do período de avaliação, os grupos tratados apresentaram diferença estatística significativa da área da ferida em relação ao grupo controle e o grupo que recebeu a FVE do tecido adiposo apresentou o menor tempo de cicatrização da ferida. Através do estabelecimento do cultivo as células mesenquimais obtidas são congeladas em meio de congelamento constituído de DMSO a 10% em SFB e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  ou em nitrogênio líquido, possibilitando a formação de banco de células para posterior utilização. A viabilidade observada após o descongelamento pela exclusão do azul de trypan foi acima de 90%.

## **CONCLUSÃO**

As MSCs encontram-se atualmente como a nova promessa na terapia contra diversos tipos de doenças, sejam elas congênicas/hereditárias ou adquiridas, em animais e seres humanos. Os resultados obtidos através de pesquisas realizadas, utilizando as frações totais de células da MO e TA, demonstram a possibilidade de utilização de células de diferentes tecidos, uma vez que essas células são passíveis de adaptação ao cultivo, expansão e armazenagem. A padronização de técnicas para o processamento, identificação e

caracterização dessas células permitirá o desenvolvimento de ensaios clínicos de forma que seja possível definir com segurança suas indicações e eficácia em pacientes.

## REFERÊNCIAS

1. Del Carlo RJ, Monteiro BS, Argolo Neto NM. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. *Revista Ceres* 2009; 56(4):446-450.
2. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1964; 51(1): 29–36.
3. Drzewiecki BA, Thomas JC, Tanaka ST. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: current and future applications in the urinary bladder. *Stem Cells International* 2010; 2010(765167):1-5.
4. Torres FC. Panículo adiposo interescapular de coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como fonte de células-tronco [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.
5. Monteiro BS, Argolo Neto NM, Del Carlo RJ. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural* 2010; 40(1):238-245.
6. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *Journal of Nippon Medical School* 2009; 76(2):56-66.
7. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2009; 31(1):25-35.
8. Teixeira MW, Rezende CMF. Imunossupressão e transplantes: perspectivas atuais e futuras. *Revista Medvep* 2004; 2(7):205-210.
9. Tharasanit T, Phutikanit N, Wangdee C, Soontornvipart K, Tantrajak S, Kaewamatawong T, et al. Differentiation potentials of canine bone marrow mesenchymal stem cells. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 2011; 41(1):79-86.
10. Semedo P, Costa MC, Cenedeze MA, Malheiros DMAC, Shimizu MHM, Seguro AC, et al. Papel imunossupressor e remodelador das células-tronco mesenquimais em um modelo experimental de doença renal crônica. *Einstein* 2009; 7(4):469-479.
11. Casteilla L, Benard VP, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. *World Journal Stem Cells* 2011; 3(4):25-33.
12. Silva CL. Estudos Moleculares de células-tronco mesenquimais cultivadas In Vitro [tese]. Rio de Janeiro: Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional do Câncer; 2009.

13. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell. *Bloodjournal* 2005; 105(4):1815-1822.
14. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of Internal Medicine* 2007; 262:509-525.
15. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio Journal of Medicine* 2005; 54(3):132-141.
16. Zhang Y, Kropp BP, Lin HK, Cowan R, Cheng EY. Bladder regeneration with cell-seeded small intestinal submucosa. *Tissue Engineering* 2004; 10(1/2):181-187.
17. Zhang Y, Lin HK, Frimberger D, Epstein RB, Kropp BP. Growth of bone marrow stromal cells on small intestinal submucosa: an alternative cell source for tissue engineered bladder. *Bju International* 2005; 96:1120-1125.
18. Kuo T, Lin H, Yang K, Lin F, Chen M, Wu C, et al. Bone Marrow Combined With Dental Bud Cells Promotes Tooth Regeneration in Miniature Pig Model. *Artificial Organs* 2010; 35(2):113-121.
19. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001; 7(2):211-228.
20. Jack GS, Zhang R, Lee M, Xu Y, Wu B, Rodríguez LV. Urinary bladder smooth muscle engineered from adipose stem cells and a three dimensional synthetic composite. *Biomaterials* 2009; 30(19):3259-3270.
21. D'aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A. Dental Pulp Stem Cells: A promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Reviews* 2008; 4:21–26.
22. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research* 2002;81(8):531-535.
23. Dissanayaka WL, Zhu X, Zhang C, Jin L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. *Journal Odontology Endodontic* 2011; 37(8):1074-1080.
24. Patricio LFL. Isolamento, cultivo e diferenciação de células-tronco mesenquimais de cães [dissertação]. Curitiba: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná; 2010.
25. Maciel BB. Isolamento, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de gato [dissertação]. Curitiba: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná; 2010.

26. Fadel L. Caracterização morfológica das células-tronco mesenquimais de sangue umbilical e de tecido adiposo coletadas por via intra-abdominal e uterina em ovinos [dissertação]. São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Universidade de São Paulo; 2009.
27. Tapp H, Hanley Jr. EN, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Experimental Biology and Medicine* 2009; 234:1-9.
28. Seo MS, Jeong YH, Park JR, Park SB, Rho KH, Kim HS, et al. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Journal Veterinary Science* 2009; 10(3):181-187.
29. Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science* 2006; 119:2204-2213.
30. Colomé LM, Gomes C, Crosignani N, Paz AH, Lugo AA, Guimarães KM et al. 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* 2008; 38(9):2529-2534.
31. Fontes EB. Hidroxiapatita sintética associada ou não à fração total de células mononucleares na regeneração de osso alveolar de cães [dissertação]. Santa Maria: Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria; 2009.
32. Oliveira GK, Raiser AG, Olsson D, Salbego FZ, Martins DB, Dezengrine R, et al. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2010; 62(1):72-79.
33. Treichel TLE, Cunha MGMCM, Cunha JPCM, Santos Júnior EB, Leme Júnior PTO, Costa MM, et al. Transplante de fração total de células mononucleares ou fração vascular estromal associada à membrana celulósica em feridas cutâneas experimentais de coelhos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2011; 48(1):62-72.

## 2.2 Artigo II

**Caracterização de cálculos vesicais e urinálise em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) submetidos a alotransplante parcial de vesícula urinária e tratados com células-tronco mesenquimais alogênicas derivadas do tecido adiposo (ADSCs)**

**Characterization of bladder stones and urinalysis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) subjected to partial urinary bladder allotransplantation and treated ADSCs**

Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho<sup>4\*</sup>, Ney Luis Pippi<sup>4</sup>

Manuscrito submetido ao periódico **Ciência Rural**

### RESUMO

A litíase vesical pode ser um achado comum quando se faz a reconstrução da bexiga, condição que pode estar associada à alterações precoces como cristalúria e presença de depósito de sais. O objetivo deste artigo é caracterizar os cálculos e a urinálise de coelhos domésticos submetidos a alotransplante de vesícula urinária e tratados com células-tronco alogênicas derivadas do tecido adiposo (ADSCs). Foram utilizados 25 coelhos Nova Zelândia Branco, os quais foram submetidos a alotransplante parcial de bexiga, sendo tratados com ciclosporina (GCi) ou células-tronco mesenquimais (GCe). Conclui-se que houve menor número (33.3%) de animais com cálculo vesical no grupo tratado com ADSCs, sendo cálcio o mineral mais prevalente em ambos os grupos. A urinálise revelou que os animais tratados com ADSC não demonstraram hematúria e/ou bacteriúria.

**Palavras-chave:** bexiga, CTM, urolitíase, cirurgia.

---

<sup>4</sup> Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. \*Autor para correspondência. Rua João Batista da Cruz Jobim, 115/203 – Santa Maria, RS. Cep. 97060-330. E-mail: [saulovet2011@hotmail.com](mailto:saulovet2011@hotmail.com).

## ABSTRACT

Bladder stones can be a common finding in reconstructive bladder surgery, which can be associated with early presence of crystalluria, and salt deposits. The objective of this paper is to characterize the stones and urinalysis in domestic rabbits undergone to urinary bladder allotransplant and treated with ADSCs. Were used 25 New Zealand White rabbits, which underwent partial allotransplant bladder, being treated with cyclosporine (GCi) or ADSCs (GCe). There were fewer animals (33.3%) with bladder calculus in the group treated with ADSCs; calcium was the most prevalent mineral in both groups. Urinalysis showed that MSC-treated animals showed no hematuria and/or bacteriuria.

**Key words:** bladder, MSC, urolithiasis, surgery.

## INTRODUÇÃO

A urina é uma solução estável, sendo que qualquer variação no grau de saturação, do pH urinário e concentração dos inibidores da cristalização pode alterar o equilíbrio existente e dar origem a urolitíase em humanos (TORRICELLI et al., 2012). Em cães e gatos a urolitíase é causa comum de doença do trato urinário inferior. Não foram ainda estabelecidas percentagens de incidência nestas espécies, mas se situam entre 0,2 e 3%. Muitos minerais podem precipitar no trato urinário, sendo os mais comuns a estruvita e o oxalato de cálcio (BARTGES & LANE, 2007).

A urina dos coelhos difere da urina das outras espécies, uma vez que esta normalmente contém muitos cristais de carbonato de cálcio. Os cálculos diagnosticados são geralmente constituídos por esse componente e ocorrem mais em coelhos domésticos. Devido ao metabolismo único do cálcio na referida espécie, animais alimentados com dieta rica desse mineral excretam no mesmo volume de urina uma quantidade de cálcio maior, o que resulta na formação das “lamas”. Posteriormente pode então ocorrer agregação de cristais e formação

de cálculos. Essa última condição em coelho é habitualmente atribuída ao excesso destes cristais na urina, que por sua vez, é originada por excesso deste elemento na dieta. No entanto, esta relação entre a formação de cálculos e o excesso de cálcio da dieta ainda não foi comprovada (LOPES, 2010).

PIECHOTA et al. (1998) utilizaram a matriz acelular como xenoinxerto de bexiga em ratos com o objetivo de verificar a diminuição da antigenicidade da matriz acelular. Foram preparadas matrizes de hamster, coelho e cão para enxertar nos ratos, após cistectomia parcial nos mesmos. Os animais do grupo controle foram submetidos apenas a cistectomia. Os autores verificaram a formação de cálculos vesicais em 29% dos animais do grupo controle, com média de 1,1 cálculo/animal. Em contraste, nos animais enxertados foi observada presença de cálculos em 85% destes, sendo a média de 7,5 cálculos/animal. O tipo de cálculo mais prevalente no estudo foi estruvita, variando de 60 a 100% dos cálculos encontrados na vesícula urinária dos ratos tratados.

OLIVEIRA et al. (2008) implantaram um retalho de membrana peritoneal bovina em substituição a um fragmento da face ventral da bexiga de coelhos Nova Zelândia adultos, objetivando avaliar o processo de reparação tecidual no que se referia à biocompatibilidade, capacidade de reparação tecidual e a possíveis complicações. Os autores verificaram que, macroscopicamente, em todos os períodos houve aderências de estruturas adjacentes ao local do implante, presença de cálculos e ausência de sinais de rejeição. Nesta oportunidade verificou-se que os implantes propiciaram a formação de cálculos, constituídos por carbonato de cálcio.

TEIXEIRA et al. (2007) testaram o alo-transplante de bexiga em cães, por meio de cistectomia parcial preservando o trígono e utilizando a ciclosporina como agente imunossupressor. Neste estudo, os animais não apresentaram sinais compatíveis com

formação de cálculo, após 60 dias de pós-operatório que foi o período de observação utilizado.

O objetivo deste artigo é caracterizar os cálculos e a urinálise de coelhos domésticos submetidos ao alotransplante de vesícula urinária e tratados com ADSCs alogênicas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Para a elaboração deste experimento foram utilizados 25 (vinte e cinco) coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia Branco, sendo 24 fêmeas e um macho, adultos, clinicamente sadios e peso médio de  $3,73 \pm 0,88$  kg, oriundos do Biotério Central da UFSM.

Todos os animais foram alojados em gaiolas individuais, por um período mínimo de 15 dias para sua adaptação às condições ambientais e ao convívio humano, bem como para detecção de possíveis enfermidades. Durante todo o experimento permaneceram em boxes individuais, recebendo ração e água à vontade. Foram submetidos a exame clínico prévio e coleta de sangue para análise laboratorial (hemograma, contagem de plaquetas, dosagem de ureia e creatinina, ALT, AST, FA e urinálise).

Após o período de observação, os animais foram separados e identificados em dois grupos experimentais (GCi e GCe), sendo cada um composto por 12 animais, conforme o tipo de tratamento. Os grupos foram subdivididos em dois subgrupos, com seis animais cada. Todos os subgrupos tiveram os períodos de avaliação de 15 e 30 dias. Após o procedimento de transplante os animais do GCi foram tratados com ciclosporina ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), i.v., a cada 24 horas até o término do período de avaliação. Os do GCe receberam apenas ADSCs, na dose de  $2 \times 10^6$  células/ml, processadas e cultivadas em laboratório, após a terceira passagem, intramuralmente e lateralmente a sutura do enxerto na face vesical receptora.

O protocolo utilizado para processamento e cultivo das ADSCs está de acordo com o citado por PINTO FILHO et al. (2013). As células da terceira passagem foram incubadas e

submetidas a caracterização por citometria de fluxo com os anticorpos anti-CD105, anti-CD90, anti-CD45 e anti-CD73, de humano, nas diluições recomendadas pelo fabricante, a saber, 5:100, 5:100, 20:100 e 10:100, respectivamente. Após 30 minutos de incubação com os anticorpos a temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS e ressuspendidas em 400mL de PBS para aquisição dos dados no citômetro de fluxo BD FACSDiva (BD Bioscience).

#### *Protocolo anestésico e procedimento cirúrgico para o transplante vesical*

No período anterior ao procedimento cirúrgico todos os animais foram pesados e submetidos a tricotomia ampla, da parede abdominal, para a realização do transplante, e das orelhas, para acesso à veia auricular caudal.

A medicação pré-anestésica foi constituída da associação de cloridrato de cetamina (20 mg kg<sup>-1</sup>), maleato de midazolam (2 mg kg<sup>-1</sup>) e sulfato de morfina (5 mg kg<sup>-1</sup>), por via intramuscular (i.m.). A seguir, os animais eram encaminhados para o bloco cirúrgico do Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE) da UFSM. Após realizava-se indução anestésica com isofluorano, através do uso de máscara, e antibioticoprofilaxia com ampicilina sódica (20 mg kg<sup>-1</sup>) pela via intravenosa (i.v.). A manutenção anestésica era realizada com isofluorano ao efeito, através do uso de máscara, com sistema inalatório aberto (vaporizador universal), vaporizado em 100% de oxigênio, com respiração espontânea.

A manutenção do acesso venoso era feita com solução de Ringer com lactato, por meio de canulação da veia auricular caudal com cateter 24G, durante todo o procedimento cirúrgico, em gotejamento venoso de 10 mL kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Os animais foram operados aos pares, com procedimentos simultâneos no mesmo ambiente cirúrgico, sendo que cada coelho foi doador e receptor. As operações foram realizadas através de incisão pré-púbica com bisturi, passando através do tecido subcutâneo e chegando-se a linha alba, sendo a mesma incisada com bisturi e com tesoura de Metzenbaum.

Na sequência, a bexiga era localizada, exteriorizada e esvaziada através de cistocentese, quando necessário. Após, isolava-se a bexiga com compressas úmidas em solução de NaCl 0,9%, três reparos eram colocados no ápice vesical, com fio de náilon 3-0, área em que o orifício foi criado. A bexiga era excisada no seu ápice removendo-se aproximadamente 30% da mesma (vazia), deixando-se os reparos na porção remanescente. A seguir, a porção removida era lavada com solução de Ringer com lactato e posteriormente aposicionada com a bexiga remanescente do outro animal em plano único, com fio absorvível de poliglactina 910 5-0 em padrão contínuo simples, abrangendo da serosa a submucosa. Ao término da sutura, realizava-se o teste de repleção da bexiga com solução salina para verificar possíveis vazamentos. As CTMs eram colocadas conforme previamente explicado. A sutura da linha alba foi realizada com poliglactina 910 3-0 em padrão isolado tipo Sultan, sendo que o espaço subcutâneo reduzido com o mesmo material e padrão contínuo simples. A sutura cutânea foi obtida com náilon 4-0 e pontos isolados em padrão Wolff.

No pós-operatório imediato os animais eram monitorados até o restabelecimento completo da consciência e então encaminhados novamente para os seus boxes individuais. Como analgésico foi administrado cloridrato de tramadol ( $6 \text{ mg kg}^{-1}$ ), i.m., a cada 8 horas, durante três dias. A limpeza da ferida cirúrgica foi realizada com solução de NaCl 0,9% uma vez a cada dois dias. A remoção dos pontos cutâneos foi feita após sete dias do procedimento cirúrgico. Neste período e até a retirada dos pontos os animais eram avaliados clinicamente para identificação de alguma anormalidade relacionada ao procedimento cirúrgico, bem como para a avaliação da micção no sentido de produção de urina e aspecto da mesma.

#### *Avaliações pós-operatórias*

A avaliação clínica foi realizada diariamente, a partir do dia da cirurgia até o final do período de avaliação previamente determinado (15 ou 30 dias). Nesta avaliação foram observados parâmetros comportamentais, alimentares e de micção, sendo verificado se os

animais urinavam normalmente e o aspecto da urina. A coleta de sangue e análise laboratorial foi realizada antes do procedimento cirúrgico e no dia da avaliação de cada animal, conforme o subgrupo.

Após o término dos períodos de avaliação e coleta de material, os animais foram submetidos a eutanásia. Para o procedimento, foram sedados com associação de cloridrato de cetamina ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ), maleato de midazolam ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e sulfato de morfina ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), i.m., com posterior aplicação de propofol ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ), i.v., na veia auricular caudal, conforme diretrizes do CONCEA.

Os cálculos vesicais encontrados nos animais durante a necropsia foram analisados quimicamente no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSM, utilizando-se um kit<sup>a</sup> com metodologia baseada em um conjunto de métodos físico-químicos.

#### *Análise estatística*

Para cálculo das médias utilizadas neste experimento foi utilizado o software Microsoft Office Excel for Windows 7. Para a comparação das médias utilizou-se o Teste t pareado, considerando-se as diferenças significativas quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todos os animais toleraram o procedimento e tiveram uma recuperação satisfatória não apresentando nenhuma alteração comportamental ou sinal de rejeição do enxerto durante o período de avaliação pós-cirúrgica até a avaliação final. Relacionado à alimentação e à ingestão hídrica, todos eram monitorados diariamente e em nenhum momento apresentaram alteração nas quantidades ingeridas de ração e água. Também não foram observados sinais de peritonite em função de deiscência de sutura ou rejeição ao implante em nenhum dos animais participantes do experimento durante os períodos de observação, concordando com os

achados de OLIVEIRA et al. (2008). No estudo realizado por TEIXEIRA et al. (2007) três animais morreram, entre 35 e 50 dias de pós-operatório, apresentando sinais característicos de rejeição ao implante.

Os coelhos do GCi foram submetidos a aplicação diária de ciclosporina durante todo o período de observação, o que poderia causar efeitos colaterais. Segundo MENDES & BURDMANN (2002) o efeito colateral mais importante da ciclosporina é a nefrotoxicidade, que pode apresentar-se de forma aguda ou crônica. A aguda caracteriza-se por comprometimento renal de natureza funcional e reversível, sem a presença de alterações histológicas renais significativas. Clinicamente, manifesta-se por elevações assintomáticas na creatinina sérica, demora na recuperação da função renal após o transplante renal e mais raramente, por síndrome hemolítico-urêmica. Tanto estes autores quanto DIEDERICH et al. (1994) concordam que a causa desta nefrotoxicidade é a intensa vasoconstrição causada na arteríola aferente provocada pela ciclosporina, gerando hipertensão e diminuindo o fluxo sanguíneo renal. No presente estudo não foi verificado nenhum sinal compatível com nefrotoxicidade nos animais tratados com o imunossupressor (GCi). Os valores de creatinina sérica ficaram entre 1,2 e 1,7mg/dL de sangue, dentro da normalidade para a espécie (0,5-2,5mg/dL). Foi observada variação dos valores de ureia sérica, os quais ficaram entre 33,4 a 69,2mg/dL, altos para a espécie (20-45mg/dL). Segundo MELILLO (2007) a ureia é um produto do catabolismo proteico, portanto, os níveis de ureia em coelhos variam de acordo com a quantidade e qualidade das proteínas da dieta, estado nutricional, função hepática, absorção intestinal, atividade enzimática da flora cecal, entre outros. Por isso, muitas vezes pequenas mudanças nos níveis de ureia são de difícil interpretação, até porque podem estar também associadas ao próprio procedimento cirúrgico.

No atual estudo, 58,3% (7/12) dos animais do GCi apresentaram cálculos vesicais, porém, apenas 33,3% (4/12) dos coelhos do GCe apresentaram urolitíase vesical, conforme

demonstrado na tabela 1. Em ambos os grupos as concreções apresentavam-se aderidas na face interna do implante (Figura 1A e B). PIECHOTA et al. (1998), ao implantar matriz acelular de três espécies diferentes em ratos também verificou uma percentagem bem maior de cálculos vesicais nos animais enxertados quando comparado ao grupo controle, o qual não sofreu enxertia. Segundo TEIXEIRA et al. (2007), a litíase vesical é um achado comum quando se faz a reconstrução da bexiga e que alterações como cristalúria e presença de depósito de sais podem ocorrer precocemente após cirurgias reparadoras da bexiga, porém em seu estudo realizado com cães não foram observados sinais compatíveis com tais alterações. Já OLIVEIRA et al. (2008) verificaram que os implantes propiciaram a formação de cálculos constituídos por carbonato de cálcio, mas não por estruvita, oxalato de cálcio e fosfato de cálcio, conforme haviam constatado outros autores até então. Na presente pesquisa verificou-se a presença de diferentes constituintes nos cálculos, na sua maioria, carbonato, fosfato e urato de cálcio (Tabela 1). No experimento de PIECHOTA et al. (1994), utilizando ratos, o tipo de cálculo predominante foi estruvita. Isto pode ser explicado pelo fato de que, nos mamíferos, 60 a 65% do cálcio filtrado nos néfrons é reabsorvido no túbulo proximal, e menos de 2% do cálcio do filtrado glomerular é excretado na urina. Quando a concentração sanguínea de cálcio aumenta, aumenta a filtração glomerular do cálcio ou diminui a sua reabsorção em nível do túbulo proximal, o que origina calciúria. No coelho, a excreção urinária de cálcio aumenta paralelamente à quantidade de cálcio da dieta. A percentagem de cálcio que pode ser filtrada pelos néfrons é maior que a do restante dos mamíferos e a percentagem de cálcio excretado na urina pode alcançar os 44.9% (LOPES, 2010). Já OLIVEIRA (2008), utilizando xenoenxerto na reconstituição vesical de cães suturado com poliglactina 910, não observou formação de cálculos vesicais.

A urina das amostras dos dois grupos coletadas após o transplante apresentou coloração amarelo-palha a amarelo-escuro e aspecto límpido a turvo. A densidade média do

G<sub>Ci</sub> foi de  $1.035,60 \pm 9,63$  e o pH  $6,60 \pm 1,08$  aos 15 dias de pós-operatório; nos animais avaliados aos 30 dias a densidade média foi de  $1.030,00 \pm 2,45$  e o pH médio  $6,30 \pm 0,84$ . Já a densidade média do G<sub>Ce</sub> foi de  $1.051,67 \pm 13,17$  e o pH  $7,92 \pm 1,36$  aos 15 dias de pós-operatório; aos 30 dias a densidade média foi  $1.054,60 \pm 6,31$  e o pH  $8,40 \pm 1,34$ . OLIVEIRA et al. (2008) publicaram menor média na densidade urinária dos seus animais (1.030) e variação no pH entre 8,0 e 9,0, não sendo divulgada a média do pH. No presente estudo três animais do G<sub>Ci</sub> e nove do G<sub>Ce</sub> apresentaram formação de cristais na urina, sendo que o fato de apresentarem cristais não confirmou a formação de cálculo e vice-versa. LOPES (2010) confirma a presença de cristais em urinas de coelhos normais, sem cálculos, mas explica que a formação de cálculos de carbonato de cálcio no coelho é habitualmente atribuída ao excesso destes cristais na urina, que por sua vez, é originada por um excesso deste elemento na dieta. No entanto, esta relação entre a formação de cálculos e o excesso de cálcio da dieta ainda não foi comprovada. A cristalúria no G<sub>Ci</sub> foi composta por carbonato de cálcio, concordando com o estudo de OLIVEIRA et al. (2008), e no G<sub>Ce</sub> carbonato de cálcio e fosfato triplo, o que pode ser justificado pela alcalinização urinária neste grupo em relação ao G<sub>Ci</sub>. Na tabela 2 estão colocados os principais dados de urinálise dos animais que apresentaram cálculos vesicais nos dois grupos estudados. Constatou-se na urinálise dos animais do G<sub>Ce</sub> que apresentaram litíase vesical não apresentaram hemácias e bactérias na urina, enquanto que nos do G<sub>Ci</sub> houve presença de bactérias.

No presente estudo, para marcação positiva foram utilizados os anticorpos anti-CD105, anti-CD90 e anti-CD73; para a marcação negativa utilizou-se o anti-CD45, recomendados por BYDLOWSKI et al. (2009). Durante o cultivo celular observou-se aderência celular ao plástico das garrafas de cultivo e morfologia fibroblastóide.

## CONCLUSÃO

Houve menor número de animais com cálculo vesical no grupo tratado com ADSCs, sendo cálcio o mineral mais prevalente em ambos os grupos. A urinálise revelou que os animais tratados com ADSCs não demonstraram hematúria e/ou bacteriúria.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a empresa Bioclin-Quibasa pela doação do kit para análise de cálculo renal (K008) utilizado nesse estudo. À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela viabilização da bolsa de estudo de doutorado, que possibilitou o desenvolvimento deste e de outros projetos de pesquisa.

## FONTE DE AQUISIÇÃO

a – Kit Cálculo Renal K008<sup>®</sup> - Bioclin-Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil.

## COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria sob parecer número 066/2011, seguindo os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

## REFERÊNCIAS

BARTGES, J.W; LANE, I.F. Tratamento clínico da urolitíase. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2007, cap.114, p.1661-1672.

BYDLOWSKI, S.P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.1, p.25-35, 2009. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842009005000038>>. Acesso em: 08 out 2014. doi: 10.1590/S1516-84842009005000038.

DIEDERICH, D. et al. Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. **Hypertension**, v.23, p.957-961, 1994. Disponível em: <<http://hyper.ahajournals.org/content/23/6/957>>. Acesso em: 06 ago 2014. doi: 10.1161/01.HYP.23.6.957.

LOPES, A.C.S. **Cristálúria em coelhos**. 2010. 76f. Monografia (Graduação) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

MELILLO, A. Rabbit Clinical Pathology. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.16, n.3, p.135-145, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1557506307000857>. Acesso em: 09 ago 2014. doi: 10.1053/j.jepm.2007.06.002.

MENDES, G.E.F.; BURDMANN, E.A. Comparação da nefrotoxicidade experimental de duas formulações de microemulsão de ciclosporina A. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.24, p.18-25, 2002. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/JBN/24-s1/4-Nefrotoxico.pdf>>. Acesso em: 08 out 2014.

OLIVEIRA, T.C. et al. Cistoplastia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com peritônio bovino conservado em glicerol a 98%. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2218-2224, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000800020>>. Acesso em: 08 out 2014. doi: 10.1590/S0103-84782008000800020.

OLIVEIRA, L.L. **Reconstituição vesical em cães (*canis familiaris*): xenoenxerto com túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98%**. 2008. 61f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

PIECHOTA, H.J. et al. Functional rat bladder regeneration through xenotransplantation of the bladder acellular matrix graft. **British Journal of Urology**, v.81, p.548–559, 1998.

Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1464-410x.1998.00608.x>>.

Acesso em: 08 out 2014. doi: 10.1046/j.1464-410x.1998.00608.x.

PINTO FILHO, S.T.L. et al. Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.49-59, 2013.

Disponível em: < <http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/652>>. Acessado em 10 nov 2013.

TEIXEIRA, M.W., et al. Avaliação clínica e histopatológica de alo-transplante de bexiga em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p. 350-357, 2007.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000200013>. Acesso em: 10 nov 2013. doi: 10.1590/S0102-09352007000200013.

TORRICELLI, F.C.M. et al. Tratamento cirúrgico da litíase vesical: revisão de literatura. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.40, n.3, p.227-233, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69912013000300011>>. Acesso em: 08 out 2014. doi: 10.1590/S0100-69912013000300011.

Tabela 1 – Caracterização (composição) dos cálculos vesicais de coelhos que apresentaram a alteração após alotransplante parcial de vesícula urinária.

Animal	Grupo	Carbonato	Oxalato	Fosfato	Cálcio	Magnésio	Amônio	Urato	Cistina
C1 (15d)	Gci	+	-	+	+	-	-	+*	+*
C2 (15d)	Gci	+	-	+	+	-	-	+*	+*
C3 (15d)	Gci	+	-	+	+	-	-	+	-
C6 (15d)	Gci	-	-	+	+	-	-	+	-
C7 (30d)	Gci	-	-	+	+	+	+	+	-
C8 (30d)	Gci	+	-	+	+	-	-	+	+
C10 (30d)	Gci	-	-	+	+	-	-	+*	-
C13 (15d)	Gce	+	-	+	+	-	-	-	-
C18 (30d)	Gce	+	-	+	+	-	-	+	-
C20 (30d)	Gce	+	-	+	+	+	+	+	-
C21 (30d)	Gce	+	-	+	+	-	-	+	-

\* baixa quantidade

Tabela 2 – Características da urinálise dos coelhos que apresentaram cálculos vesicais após alotransplante parcial de vesícula urinária.

Animal	Grupo	Densidade	pH	Proteína	Sg oculto	Cristais	Hemácias	Bactérias
C1 (15d)	Gci	1048	7,5	+	++	Carbonato de Ca	-	Raras
C2 (15d)	Gci	1028	7,0	-	-	-	-	++
C3 (15d)	Gci	1040	5,0	-	++	-	0-2	Raras
C6 (15d)	Gci	1038	6,0	Traços	++	-	70	Raras
C7 (30d)	Gci	1028	7,0	++	+	Carbonato de Ca	0-4	Raras
C8 (30d)	Gci	1030	5,0	Traços	-	-	-	Raras
C10 (30d)	Gci	1030	6,5	++	+++	Carbonato de Ca	15-25	Raras
C13 (15d)	Gce	1036	9,0	Traços	+	-	-	-
C18 (30d)	Gce	1045	9,0	+++	-	-	-	-
C20 (30d)	Gce	1060	6,0	+++	++	Carbonato de Ca	-	-
C21 (30d)	Gce	1060	8,0	+	-	Estruvita (++) e carbonato de Ca (+)	-	-

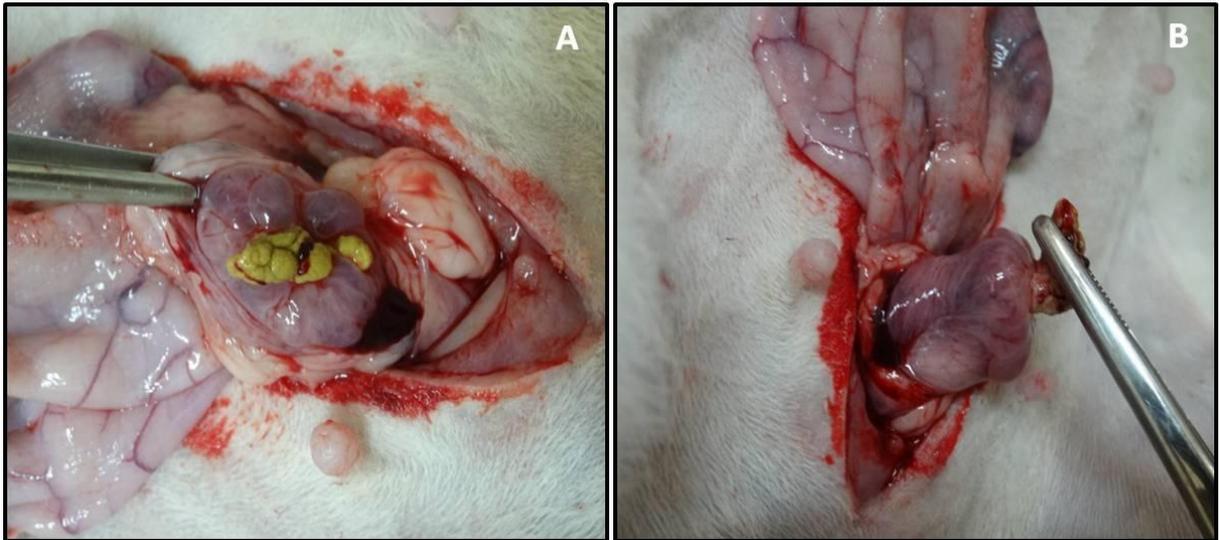


Figura 1 –Imagem da bexiga da coelha 1 (GCi) demonstrando a presença de cálculo (A). Observar a aderência do cálculo a mucosa do implante (B).

## 2.3 Artigo III

### **Avaliações clínica, ultrassonográfica e anatomofisiológica do alotransplante parcial de vesícula urinária com células-tronco mesenquimais alogênicas derivadas do tecido adiposo em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**

Clinical, sonographic, anatomic and physiological assessments of partial allotransplant urinary bladder with allogeneic mesenchymal stem cells derived from adipose tissue in rabbits  
(*Oryctolagus cuniculus*)

Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho<sup>5</sup>, Ney Luis Pippi<sup>5</sup>

Manuscrito a ser submetido ao periódico **Ciência Rural**

#### **RESUMO**

Os problemas relacionados ao armazenamento vesical são muitos e relevantes. Eles, além de influírem de forma efetiva na qualidade de vida, podem eventualmente evoluir para falência renal. Existem vários trabalhos, os quais descrevem as propriedades imunomoduladoras e imunossupressoras das ADSCs. Objetiva-se com o presente avaliar clínica, ecográfica e anatomofisiologicamente o alotransplante parcial de bexiga a fresco em coelhos, utilizando como agente imunomodulador ADSCs alogênicas. Para isso foram utilizados 25 coelhos, sendo um deles macho e doador das CTMs, e os outros 24 fêmeas, submetidas a alotransplante parcial de bexiga, sendo tratadas com ciclosporina (GCI) ou células-tronco mesenquimais (GCE). Conclui-se que as ADSCs foram suficientes para evitar

---

<sup>5</sup> Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. \*Autor para correspondência. Rua João Batista da Cruz Jobim, 115/203 – Santa Maria, RS. Cep. 97060-330. E-mail: [saulovet2011@hotmail.com](mailto:saulovet2011@hotmail.com).

sinais clínicos e ecográficos de rejeição ao aloimplante de vesícula urinária, mantendo a estrutura anatomofisiológica vesical por até 30 dias em coelhos.

**Palavras-chave:** bexiga, ADSC, cirurgia, transplante.

## **ABSTRACT**

The problems related to bladder storage are many and significant. They, in addition to impact effectively on quality of life, can eventually progress to kidney failure. There are several studies, which describe the immunomodulatory and immunosuppressive properties of ADSCs. The objective is to evaluate clinical, by sonographic, anatomically and physiologically fresh partial allograft bladder from rabbits using as immunomodulator agent allogeneic ADSCs. For that 25 rabbits were used, one being male MSCs donor, and the other 24 females who underwent simultaneously partial allograft bladder, being treated with cyclosporine (GCi) or mesenchymal stem cells (GCe). It was concluded that ADSCs were sufficient to prevent clinical and ultrasound signs of allograft rejection of the urinary bladder. These bladders retained the anatomophysiological structure for 30 days in rabbits.

**Key words:** bladder, ADSC, surgery, graft.

## **INTRODUÇÃO**

A bexiga é um órgão muscular elástico e complacente, que recebe a urina proveniente dos rins e a armazena até a sua expulsão para o meio externo. Trata-se de uma víscera de funcionamento complexo que apresenta duas funções básicas: armazenamento da urina, em regime de baixa pressão, e esvaziamento do seu conteúdo, sob alta pressão (TEIXEIRA, 2007).

TEIXEIRA et al. (2007) testaram a hipótese de o alotransplante de bexiga devolver a capacidade estrutural e funcional desse órgão, usando-se 10 cães machos, saudáveis,

submetidos à cistectomia parcial com preservação do trígono vesical. Utilizou-se o alotransplante na reconstrução da vesícula urinária com acompanhamento dos animais durante 60 dias e como agente imunossupressor foi utilizada ciclosporina. Os autores concluíram que o alotransplante de bexiga em cães é viável, devolve a capacidade de repleção e as demais funções fisiológicas da vesícula urinária durante o período de observação. A imunossupressão, com ciclosporina, por 30 dias, demonstrou ser insuficiente para evitar os episódios de rejeição ao implante em três cães.

As terapias imunossupressoras têm apresentado uma rotina crescente, tanto na medicina veterinária quanto na humana. Apesar do índice crescente de transplantes e a concomitante utilização de agentes imunossupressores, tem se observado sensível redução na morbidade e mortalidade de pacientes submetidos a medicação continuada, o que comprova avanços obtidos nesta área. Os fármacos mais utilizados atualmente são a prednisona, ciclosporina, tacrolimus, micofenolato mofetil, sirolimus, entre outras. Porém, apesar de alguns benefícios, elas podem danificar severamente outras populações celulares, diminuindo as possibilidades de defesa do organismo. Além disso, o custo proveniente da aplicação continuada de algumas destas substâncias nos pacientes tem prejudicado a popularização das mesmas (TEIXEIRA e REZENDE, 2004).

O primeiro relato descrevendo as propriedades imunomoduladoras e imunossupressoras da ADSCs foi publicado no ano de 2005; especificamente, seus experimentos *in vitro* mostraram que a ADSC não provocou aloreatividade e foi capaz de suprimir reação de linfócitos. Além disso, descobriu-se que o efeito imunossupressor parece exigir contato célula-célula. No entanto, em outros dois estudos separados a exigência do contato célula-célula foi corroborada e contestada. Independentemente dessa divergência, o efeito imunossupressor das ADSCs foi observado de forma consistente em todos os estudos subsequentes (LIN et al., 2012).

O objetivo do presente artigo foi avaliar clínica, ecográfica e anatomofisiologicamente o alotransplante parcial de bexiga a fresco em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), utilizando como agente imunomodulador CTMs alogênicas derivadas do tecido adiposo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a elaboração deste experimento foram utilizados 25 (vinte e cinco) coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), sendo 24 fêmeas, adultas, da raça Nova Zelândia Branco e um macho, doador do tecido adiposo para a cultura celular, clinicamente saudáveis e peso médio de  $3,73 \pm 0,88$  kg, oriundos do Biotério Central da UFSM.

Todos os animais foram alojados em gaiolas individuais, por um período mínimo de 15 dias para sua adaptação às condições ambientais e ao convívio humano, bem como para detecção de possíveis enfermidades. Durante todo o período do experimento, os animais permaneceram em boxes individuais, recebendo ração e água à vontade, sendo também submetidos a exame clínico prévio e coleta de sangue para análise laboratorial e ultrassonografia (US) abdominal para avaliação vesical.

Após o período de adaptação, os animais foram separados e identificados em dois grupos experimentais (GCi e GCe), sendo cada um composto por 12 animais, conforme o tipo de tratamento. Os grupos foram subdivididos em dois subgrupos, com 6 animais cada. Todos os subgrupos tiveram os períodos de avaliação de 15 e 30 dias. Após o procedimento de transplante os animais do GCi foram tratados com ciclosporina ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), i.v., a cada 24 horas até o término do período de avaliação. Os do GCe receberam ADSCs, na dose de  $2 \times 10^6$  células/ml, cultivadas em laboratório, intramuralmente, nas laterais da sutura do enxerto na face vesical receptora.

Para colheita do tecido adiposo (TA), um coelho macho doador, foi submetido a procedimento cirúrgico de lipectomia interescapular. A medicação pré-anestésica foi

constituída da associação de cloridrato de cetamina ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ), maleato de midazolam ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e sulfato de morfina ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) por via intramuscular (i.m.). A indução e manutenção anestésica foram realizadas com isoflurano ao efeito, através do uso de máscara.

O fragmento de TA era imediatamente encaminhado em um recipiente de vidro estéril, contendo 150 mL de solução de Hanks, para o Laboratório de Terapia Celular Regenerativa.

No interior da capela de fluxo laminar, o tecido foi transferido para uma placa de Petri e seccionado várias vezes em diversos fragmentos menores. Os pequenos fragmentos de TA foram lavados com solução de Hanks, totalizando três lavagens. A gordura era transferida para tubos de polipropileno graduados, de 50 mL e adicionava-se a mesma, uma solução de 1 mg/mL de colagenase tipo II, na proporção 1:3 (volume:volume). Os tubos eram tampados e lacrados com uma película resistente a água e encaminhados ao banho-maria a uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  e agitados manualmente, a cada cinco minutos. Nestas condições, permaneciam por aproximadamente 25 minutos, até gerar um aspecto leitoso na mistura. A colagenase era neutralizada através da adição de meio completo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), em um volume de 1:1.

Os tubos de TA com DMEM adicionado foram centrifugados a 600G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. A seguir, realizou-se agitação manual vigorosa dos tubos, objetivando romper os adipócitos e promover a liberação de mais células mononucleares. Após, os tubos eram recolocados na centrífuga, por mais cinco minutos, com a mesma rotação.

O sobrenadante era descartado e a fração lavada com meio completo e centrifugada, desta vez, a 440G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. A lavagem foi repetida novamente e ao término da nova centrifugação o sobrenadante descartado e a fração vascular estromal (FVE) ressuspensa em 1mL de meio completo. Uma pequena fração (70 $\mu$ l) da FVE suspensa era colhida com pipeta automática para quantificação manual da porcentagem

de células mononucleares e teste de viabilidade celular com azul de *Trypan* 1% em lâmina de Neubauer. A seguir, as células eram plaqueadas em garrafas de cultura primária de 75cm<sup>2</sup>, com DMEM e 10% de SFB. As garrafas eram então encaminhadas para estufa a 37°C, com concentração de 5% de dióxido de carbono. A aplicação nos animais do GCe era realizada após a terceira passagem.

As células da terceira passagem foram incubadas e submetidas a caracterização por citometria de fluxo com os anticorpos anti-CD105, anti-CD90, anti-CD45 e anti-CD73, nas diluições recomendadas pelo fabricante, a saber, 5:100, 5:100, 20:100 e 10:100, respectivamente. Após 30 minutos de incubação com os anticorpos a temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 400mL de PBS para aquisição dos dados no citômetro de fluxo BD FACSDiva (BD Bioscience).

Para o procedimento cirúrgico de transplante todos os animais eram a tricotomia ampla da parede abdominal, para a realização do transplante, e das orelhas, para acesso à veia auricular caudal.

A medicação pré-anestésica foi constituída da associação de cloridrato de cetamina (20 mg kg<sup>-1</sup>), maleato de midazolam (2 mg kg<sup>-1</sup>) e sulfato de morfina (5 mg kg<sup>-1</sup>), i.m. A seguir, os animais eram encaminhados para o bloco cirúrgico do Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE) da UFSM. Após realizava-se indução anestésica com isoflurano, através do uso de máscara e a manutenção anestésica era realizada com o mesmo fármaco, através do uso de máscara, com sistema inalatório aberto (vaporizador universal), vaporizado em 100% de oxigênio, com respiração espontânea. A antibioticoprofilaxia foi realizada com ampicilina sódica (20 mg kg<sup>-1</sup>) pela via intravenosa (i.v.) 30 minutos antes do início do procedimento.

A manutenção do acesso venoso era feita com solução de Ringer com Lactato, por meio de canulação da veia auricular caudal com cateter 24G, durante todo o procedimento cirúrgico, em gotejamento venoso de  $10\text{mL kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

Os animais foram operados aos pares, com procedimentos simultâneos no mesmo ambiente cirúrgico, sendo cada um doador e receptor. As operações foram realizadas através de incisão pré-púbica com bisturi, passando através do tecido subcutâneo e chegando-se a linha Alba, incidindo-se a mesma com bisturi e tesoura Metzembraum. Na sequência, a bexiga era localizada, exteriorizada e esvaziada através de cistocentese, quando necessário. Após isolava-se a bexiga com compressas úmidas em solução de NaCl 0,9%, três reparos eram colocados no ápice vesical (Figura 1A), área em que o orifício foi criado. A bexiga era excisada removendo-se aproximadamente 30% da mesma (vazia), deixando-se os reparos na porção remanescente. A seguir, a porção removida era lavada com solução de Ringer com lactato e posteriormente suturada junto a bexiga remanescente do outro animal em plano único, com fio de poliglactina 910 5-0 em padrão contínuo simples, de modo sero-muscular (Figura 1B). Ao término da sutura, realizava-se o teste de repleção da bexiga com solução salina para verificar possíveis vazamentos. As CTMs eram colocadas ao redor da linha de sutura, mediante injeção com seringa de 1 mL e agulha 12,7mm x 0,33mm, sob a camada serosa da bexiga. A sutura da linha alba foi realizada com poliglactina 910 3-0 em padrão isolado tipo Sultan, sendo o espaço subcutâneo reduzido com o mesmo material e padrão contínuo simples. A dermorrafia foi obtida com náilon 4-0 e pontos isolados em padrão Wollf.

No pós-operatório (PO) imediato os animais eram monitorados até o restabelecimento completo da consciência e então encaminhados novamente para os seus boxes. Como analgésico foi administrado cloridrato de tramadol ( $6\text{ mg kg}^{-1}$ ), i.m., a cada 8 horas, durante três dias. A limpeza da ferida cirúrgica era realizada com solução de NaCl 0,9% uma vez a

cada dois dias. A remoção dos pontos cutâneos foi feita após sete dias do procedimento cirúrgico. Neste período e até a retirada dos pontos os animais eram avaliados clinicamente para identificação de alguma anormalidade relacionada ao procedimento cirúrgico bem como avaliação da micção no sentido de produção de urina e aspecto da mesma.

A avaliação clínica foi realizada diariamente, a partir do dia da cirurgia até o final do período de avaliação conforme o subgrupo de cada animal. Nesta avaliação foram observados parâmetros comportamentais, alimentares e de micção, sendo verificado se os animais urinavam normalmente e o aspecto da urina. A análise laboratorial (hemograma, contagem de plaquetas, dosagem de ureia e creatinina, ALT, AST, FA e urinálise) foi realizada antes do procedimento cirúrgico e no dia da avaliação de cada animal, conforme o período de avaliação do subgrupo.

A ultrassonografia foi utilizada para avaliar a funcionalidade, integridade parietal e morfologia vesicais. O procedimento era realizado imediatamente anterior ao procedimento cirúrgico de transplante e no dia da avaliação de cada animal, conforme o subgrupo. No procedimento foi utilizada uma probe linear de 8-15 MHz, conectada a um aparelho de ultrassonografia bidimensional Shimadzu, modelo SDU 1100.

Como o estudo foi desenvolvido em fêmeas, e como foram administradas CTMs de macho, buscou-se a expressão do gene SRY em uma amostra da interface enxerto-bexiga receptora, coletada dos animais do GCe para verificar ou não a presença das células no local após 15 ou 30 dias da aplicação. A técnica foi realizada no Laboratório de Biogenômica da UFSM, por meio da PCR, efetuando-se a extração e amplificação do DNA das amostras. Como controle positivo foi utilizado amostra contendo DNA de machos e para controle positivo da reação utilizou-se o Primer GAPDH.

Para cálculo das médias foi utilizado o software Microsoft Office Excel for Windows 7. Para a comparação das médias utilizou-se o Teste t pareado. Considerou-se diferenças significativas quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Ambos os tratamentos utilizados na pesquisa alcançaram resultados clínicos satisfatórios, impedindo a rejeição do aloenxerto. Todos os animais tiveram recuperação satisfatória, não apresentando nenhuma alteração clínica ou comportamental em decorrência do tratamento durante todo o período de avaliação pós-cirúrgica. Relacionado a alimentação e ingestão hídrica, todos eram monitorados diariamente e em nenhum momento apresentaram alteração nas quantidades ingeridas de ração e água. Também não foram observados sinais de peritonite em função de deiscência de sutura vesical ou rejeição ao implante em nenhum dos animais até os 30 dias de observação, concordando com os resultados encontrados por PIECHOTA et al. (1998). A ciclosporina, utilizada no GCi, já é preferida por outros pesquisadores como agente imunossupressor em animais transplantados (TEIXEIRA et al., 2007; CHAVES et al., 2008). No estudo realizado por TEIXEIRA et al. (2007) com ciclosporina, 30% dos cães morreram, entre 35 e 50 dias de PO, apresentando sinais característicos de rejeição ao implante, porém, receberam a ciclosporina por até 30 dias. Para CHAVES et al. (2008) a ciclosporina prolongou a sobrevida dos enxertos de pele em coelhos. BRANDT et al. (2004) utilizaram azotioprina por 15 dias em cães como agente imunossupressor em seu estudo com alotransplante vesical, sendo os animais observados durante 18 meses sem demonstrar sinais de rejeição.

As ADSCs, aplicadas em uma única dose no GCe, demonstraram sua característica imunossupressora, evitando a rejeição clínica do enxerto durante os períodos de avaliação e não causando nenhum efeito adverso em decorrência da sua aplicação. É incontestável que o

efeito imunomodulador e/ou imunossupressor das ADSCs foi observado de forma consistente em vários os estudos antecedentes a este (MIZUNO, 2009; CASTEILLA et al., 2011; LIN et al., 2012; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ et al., 2013). Para LIN et al. (2012), experimentos *in vitro* demonstraram que as ADSCs não provocam aloreatividade por não expressarem MHC-II em sua superfície e suprimem a atividade de linfócitos T e B, podendo ser utilizadas no tratamento da rejeição de aloenxertos de órgãos e transtornos auto-imunes. No presente estudo, observações clínicas e exames complementares revelaram que os animais tratados com as ADSCs alogênicas não demonstraram sinais de rejeição aos enxertos durante até 30 dias de observação. Segundo CAPLAN (2007) estes efeitos imunomoduladores inibem fortemente o reconhecimento e expansão de células T pela inibição do TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , aumentando os níveis de IL-10. Embora todos estes efeitos imunomoduladores ainda não tenham sido bem descritos, os dados disponíveis indicam claramente que as MSCs alogênicas podem ser utilizadas como agente terapêutico.

Apesar de não ter efeito clínico, a análise estatística revelou diferença significativa entre os animais do GCi e GCe com relação aos níveis séricos de creatinina 15 e 30 dias PO. Aos 15 dias obteve-se  $1,62 \pm 0,14$  mg/dL e  $1,38 \pm 0,12$  mg/dL ( $p=0,01$ ) para o GCi e GCe, respectivamente; aos 30 dias os valores foram de  $1,70 \pm 0,14$  mg/dL e  $1,37 \pm 0,18$  mg/dL ( $p=0,00$ ) para o GCi e GCe, respectivamente. Os resultados demonstram diminuição dos níveis de creatinina sérica dos coelhos do GCe em relação ao GCi, concordando com os encontrados com SEMEDO et al. (2009) em ratos. Ambos os grupos mantiveram os níveis de creatinina dentro dos valores de referência para a espécie.

No aspecto macroscópico das vesículas urinárias foram verificados, na maioria dos animais de ambos os grupos, espessamento parietal na área de sutura do enxerto, aderências da sutura do enxerto com estruturas adjacentes e boa integração do enxerto com o tecido vesical receptor, sem sinais de rejeição, corroborando com os resultados encontrados por

DALECK et al. (1989), OLIVEIRA et al. (2008) e OLIVEIRA (2008). Na maioria dos coelhos, em ambos os períodos de observação, foram encontradas aderências da sutura do implante com mesentério, alça intestinal, mesométrio, sutura muscular abdominal e ligamento médio ventral da bexiga. No GCe todos os animais apresentaram aderência com alguma(s) das estruturas citadas acima. OLIVEIRA et al. (2008) também observaram em seu estudo com coelhos Nova Zelândia que, em todos os períodos de observação, havia aderências da região do implante com o peritônio parietal da parede ventral do abdome.

No pós-operatório nenhuma coelha foi mantida com sonda uretral, sendo que nas primeiras 24 horas já foi observada produção de urina, a maioria com presença de hematúria, porém, sem visualização deste sinal nos dias subsequentes da avaliação PO. A quantidade de urina produzida não foi mensurada, porém, verificou-se que nas primeiras 72 horas de PO a produção era pequena, aumentando gradativamente após este período. Não foi instituída terapia antimicrobiana neste período, sendo apenas utilizada ampicilina sódica como antibioticoprofilaxia, 30 minutos antes do transplante.

No atual estudo, 58,3% dos animais do GCi apresentaram cálculos vesicais e 33,3% dos do GCe apresentaram urolitíase vesical aos 15 e 30 dias PO, visualizada na ultrassonografia e macroscopia. PIECHOTA et al. (1998), ao implantar matriz acelular de três espécies diferentes em ratos também verificou uma percentagem bem maior de cálculos vesicais nos animais enxertados quando comparado ao grupo controle, que não sofreu enxerto. Segundo TEIXEIRA et al. (2007), a litíase vesical é um achado comum quando se faz a reconstrução da bexiga e que alterações como cristalúria e presença de depósito de sais podem ocorrer precocemente, após cirurgias reparadoras da bexiga, porém em seu estudo realizado com cães não foram observados sinais compatíveis com tais alterações.

A avaliação ultrassonográfica PO da maioria dos animais (GCi e GCe) demonstrou semelhança com os exames nas avaliações pré-operatórias relacionado a integridade,

espessura da parede vesical e conteúdo. As bexigas nas ecografias pré e pós-operatórias apresentaram-se preenchidas por conteúdo heterogêneo, de moderada celularidade, parede regular em toda a sua extensão, sem evidência de extravasamento de urina, achado compatível com o de uma bexiga normal em coelho (Figura 1C e D), concordando com os resultados encontrados por OLIVEIRA (2008) que estudou cistoplastia em cães. No estudo de TEIXEIRA et al. (2007), nos primeiros 30 dias, a parede da vesícula urinária apresentou imagem ultrassonográfica de espessamento e com maior ecogenicidade, sem, contudo, perder a integridade, semelhante aos resultados encontrados em alguns animais do atual estudo. ABÍLIO et al. (2004) afirmaram em sua pesquisa com cães que as imagens ultrassonográficas entre o 7º e 21º dias de PO demonstraram pequenas alterações na conformação das bexigas situadas na face da enxertia, em ambos os grupos estudados, porém, desaparecendo no 28º dia.

O coelho macho foi utilizado como doador do tecido adiposo que, após processado seria a fonte das CTMs. Estas, por originar-se de um animal macho, devem ser detectadas pela amplificação do cromossomo Y. Ao analisar a presença das CTMs no fragmento vesical, por meio da presença do gene SRY, em ambos os grupos observou-se que as células não se encontravam mais no local. Isso se deve provavelmente ao fato de ter sido realizada uma única aplicação *in loco*, no momento do transplante. Esta também é a conclusão de SEMEDO et al. (2009), trabalhando com tecido renal de ratas Wistar. Segundo os autores, provavelmente, a administração mais frequente faz com que as CTMs consigam ser encontradas no tecido renal, como puderam observar na presença de SRY nos rins da maioria das fêmeas tratadas com CTMs de machos. CUNHA (2012), estudando células derivadas do líquido amniótico na reparação de isquemia renal, também não identificou nenhuma célula marcada nos cortes histológicos analisados no tecido renal, sendo observado somente no pulmão e baço. A autora acredita que o efeito observado após a terapia celular foi devido à secreção de fatores

solúveis das células presentes em outros órgãos, no entanto supõe que as células que eventualmente tenham enxertado no rim tenham entrado em apoptose, pois apesar de as CTMs apresentarem quimiotaxia pelos locais de inflamação, este microambiente hostil do tecido lesado, incluindo a isquemia e a fibrose, pode diminuir a sobrevivência das CTMs exógenas.

## **CONCLUSÃO**

Após os resultados obtidos neste estudo, concluí-se que as ADSCs, em única aplicação, foram suficientes para evitar sinais clínicos e ecográficos de rejeição ao aloimplante de vesícula urinária, mantendo a estrutura anatomofisiológica vesical por até 30 dias em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

## **COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA**

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria sob parecer número 066/2011, seguindo os princípios éticos e diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que viabilizou a bolsa de estudo de mestrado, que possibilitou o desenvolvimento deste e de outros projetos de pesquisa.

## **REFERÊNCIAS**

ABÍLIO, E.J. et al. Ileocistoplastia em cães (*Canis familiaris*): descrição da técnica cirúrgica. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.41, 2004.

BRANDT, F.T. et al. Transplante de bexiga: estudo piloto. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.4, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502004000400015>>. Acessado em: 03 set. 2014. doi: 10.1590/S0102-86502004000400015

CAPLAN, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v.213, n.2, p.341-347, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.21200/full>>. Acessado em: 08 out. 2014. doi: 10.1002/jcp.21200.

CASTEILLA, L. et al. Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. **World Journal Stem Cells**, v.3, n.4, p.25-33, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3097937>>. Acessado em: 14 out. 2013. doi: 10.4252/wjsc.v3.i4.25.

CHAVES, D.N.B. et al. Estudo comparativo dos efeitos da talidomida, da ciclosporina e do diclofenaco na sobrevida de aloenxertos cutâneos em coelho. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.54, n.1, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302008000100019>>. Acessado em: 11 jun. 2014. doi: 10.1590/S0104-42302008000100019.

CUNHA, MGMCM. **Superexpressão induzida de VEGF e HGF em células mesenquimais estromais do líquido amniótico na inibição da fibrose intersticial após isquemia renal aguda em ratos**. 2012. 130f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

DALECK, C.L.M. et al. Cistoplastia com peritônio autólogo em cães. **Semina**, Londrina, v.10, n.1, p.22-26, 1989. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.1989v10n1p22>> Acessado em: 03 set. 2014. doi: 10.5433/1679-0359.1989v10n1p22.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, M. et al. Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and

brain repair markers in experimental ischemic stroke. **Stem Cell Research & Therapy**, v.4, n.11, p.1-12, 2013. Disponível em: <<http://stemcellres.com/content/4/1/11>>. Acessado em: 14 out. 2013. doi:10.1186/scrt159.

LIN, C.S. et al. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. **Stem Cells and Development**, v.21, n.15, p.2770-2778, 2012. Disponível em:

<<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2012.0176>>. Acessado em: 20 jul. 2014. doi: 10.1089/scd.2012.0176.

MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. **Journal of Nippon Medical School**, v.76, n.2, p.56-76, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1272/jnms.76.56>>. Acessado em: 14 out. 2013. doi: 10.1272/jnms.76.56.

OLIVEIRA, T.C. et al. Cistoplastia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com peritônio bovino conservado em glicerol a 98%. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2218-2224, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000800020>>. Acessado em: 01 jun. 2013. doi: 10.1590/S0103-84782008000800020.

OLIVEIRA, L.L. **Reconstituição vesical em cães (*canis familiaris*): xenoenxerto com túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98%**. 2008. 61f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

PIECHOTA, H.J. et al. Functional rat bladder regeneration through xenotransplantation of the bladder acellular matrix graft. **British Journal of Urology**, v.81, p.548–559, 1998.

Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1464-410x.1998.00608.x>>.

Acessado em: 10 nov. 2013. doi: 10.1046/j.1464-410x.1998.00608.x

SEMEDO, P. et al. Papel imunossupressor e remodelador das células-tronco mesenquimais em um modelo experimental de doença renal crônica. **Einstein**, v. 7, n.4, p. 469-479, 2009.

Disponível em: <[http://apps.einstein.br/revista/arquivos/PDF/1431-Einsteinv7n4p469-79\\_port.pdf](http://apps.einstein.br/revista/arquivos/PDF/1431-Einsteinv7n4p469-79_port.pdf)>. Acessado em: 10 nov. 2013.

TEIXEIRA, M.W., REZENDE, C.M.F. Imunossupressão e transplantes: perspectivas atuais e futuras. **Revista Medvep**, v.2, n.7, p. 205-10, 2004.

TEIXEIRA, M.W. **Alo-transplante parcial de bexiga em cães (*Canis familiaris*): avaliação clínica, histológica e imunoistoquímica**. 2007. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal).

Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

TEIXEIRA, M.W. et al. Avaliação clínica e histopatológica de alo-transplante de bexiga em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p. 350-357, 2007.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000200013>>. Acessado em: 10 nov. 2013. doi: 10.1590/S0102-09352007000200013.

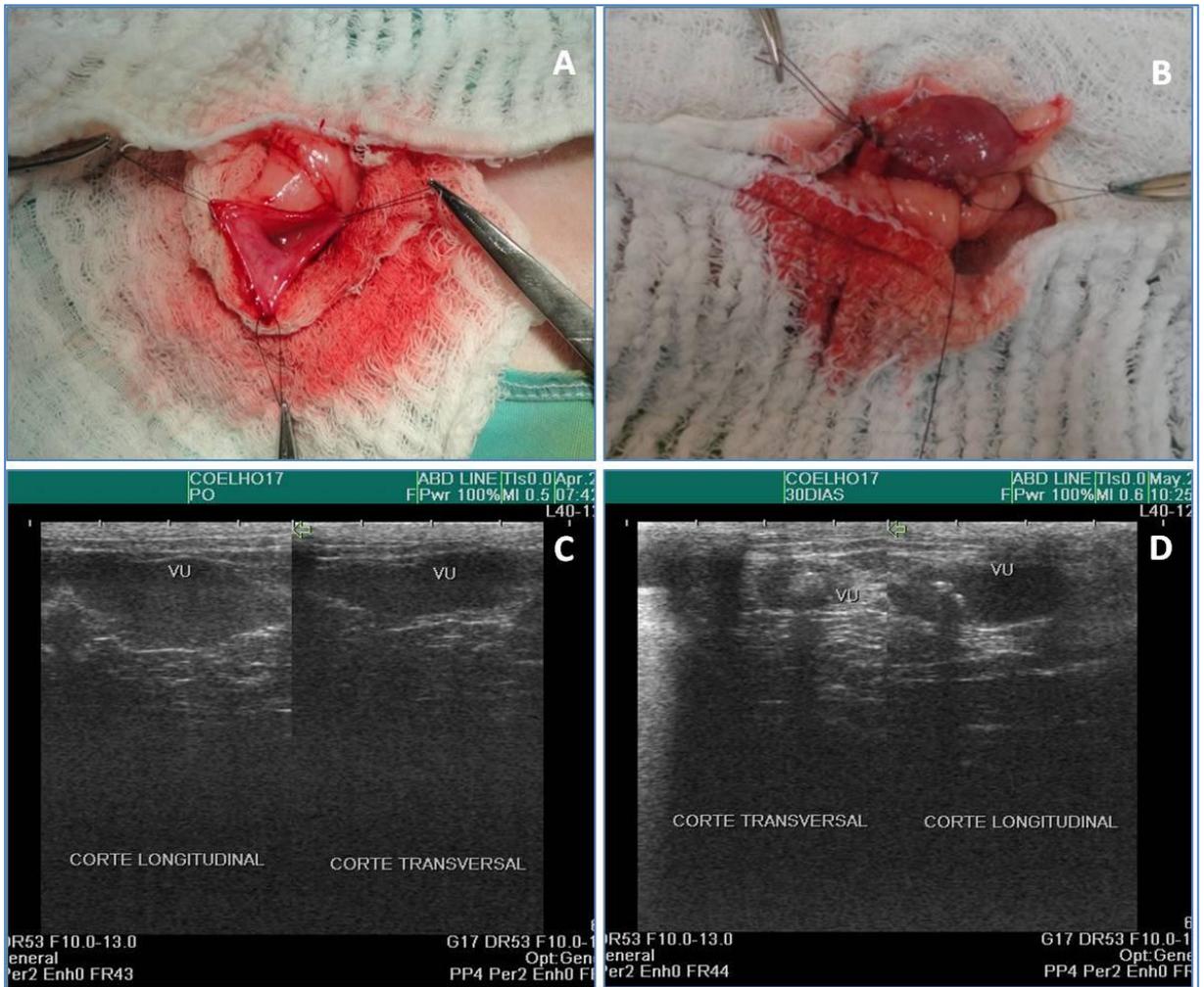


Figura 1 – Alotransplante vesical em coelhos. Colocação dos três pontos de reparo para facilitar manipulação e sutura vesicais (A) e aspecto da bexiga após sutura do implante (B). Imagem ultrassonográfica vesical da coelha 17 (GCE) antes do transplante (C) e após o mesmo (D). Vesícula urinária preenchida por conteúdo heterogêneo, de moderada celularidade, parede de espessura normal e regular.

### 3 DISCUSSÃO

Optou-se na utilização de coelhos para os experimentos em função de ser uma das espécies de laboratório mais utilizadas atualmente pela comunidade científica. Inicialmente, pensou-se em fazer uso de ratos Wistar, porém, viu-se que, diante das condições para realização da cirurgia, o tamanho da vesícula urinária do rato é muito pequeno, sendo que a bexiga do coelho também pequena quando vazia, porém, mais acessível a realização do procedimento pelo cirurgião. Outro aspecto a ser considerado é que o presente estudo é ainda inicial no que se refere a aplicação alogênica de CTMs, havendo riscos em decorrência de fenômenos de rejeição, por isso preferiu-se utilizar uma espécie de laboratório para que em estudos posteriores possam ser utilizadas outras espécies como o cão e o gato, por exemplo, que são espécies afetivamente mais próximas ao homem. YANG et al. (2005), estudando a reparação de defeito experimental em bexiga de coelhos com enxerto homólogo de matriz acelular do mesmo órgão demonstraram resultados promissores utilizando o coelho como modelo OLIVEIRA et al. (2008), ao realizarem cistoplastia experimental em coelhos com peritônio bovino conservado em glicerol a 98%, obtiveram resultados semelhantes aos vistos por outros autores que utilizaram cães.

Neste estudo não foi realizado jejum pré-operatório para nenhum dos animais utilizados; não foi observada nenhuma reação em razão desta conduta, verificando-se que os coelhos acordaram normalmente no período pós-operatório imediato e assim que estivessem totalmente conscientes era oferecida alimentação e água. Segundo RIVERA (2002) não é necessário o jejum prévio em coelhos e roedores antes da anestesia, pois esses animais não vomitam; além disso, os roedores se tornam hipoglicêmicos muito rapidamente quando em jejum.

A principal razão para o uso de anestésicos é a de prover a contenção humanitária do animal, visando, também, a atingir um grau razoável de relaxamento muscular para facilitar a

cirurgia e, principalmente, produzir analgesia suficiente a fim de que o animal não sofra (RIVERA, 2002). O protocolo anestésico utilizado no presente estudo foi suficiente para que todos os procedimentos fossem realizados com segurança para os animais e equipe cirúrgica. A combinação de quetamina com midazolam como medicação pré-anestésica, entre as recomendadas por RIVERA (2002) e BIZERRA et al. (2010), proporcionou excelente sedação e relaxamento muscular, propiciando condições para que os animais fossem tricotomizados e suas veias auriculares cateterizadas para o procedimento cirúrgico. A utilização de isoflurano como agente anestésico inalatório, por meio de máscara e vaporizado em oxigênio a 100% estabeleceu rápida indução e recuperação anestésicas, bem como segurança durante o trans-operatório. RIVERA (2002) afirmou que o isoflurano é mais seguro que o halotano, produz pouco efeito nas enzimas hepáticas, porém, é mais caro. Atualmente, a utilização deste anestésico é tão ampla que seus custos estão abaixo dos custos do uso de halotano. TREICHEL (2014) utilizou exatamente o mesmo protocolo anestésico utilizado neste estudo, não observando nenhum contratempo durante seus procedimentos de transplante de pele realizados em coelhos Nova Zelândia. OLIVEIRA et al. (2008) utilizaram acepromazina e butorfanol (i.m.) como medicação pré-anestésica, associação de tiletamina e zolazepam (i.v.) para indução anestésica e halotano como agente anestésico volátil em coelhos submetidos a cistoplastia. Os autores não relataram se foram verificadas alterações decorrentes da utilização deste protocolo ou não. Segundo RIVERA (2002) a acepromazina pode causar hipotensão. Esta mesma autora afirma que, devido ao uso do halotano, podem ser notados tremores durante a recuperação devido a seu efeito depressor cardíaco, que reduz a pressão sanguínea, sensibilizando o coração para os efeitos arrítmicos das catecolaminas.

O protocolo analgésico, realizado por meio da aplicação de sulfato morfina junto a medicação pré-anestésica, e cloridrato de tramadol, durante os três primeiros dias de pós-operatório proporcionou conforto para os animais, caracterizado pela movimentação na gaiola, alimentação, ingestão hídrica e defecação normais. Como já referido acima, a urina até

as primeiras 72 horas pós-operatórias teve diminuição no seu volume, porém, esperado para pacientes que tenham sofrido este tipo de intervenção. RIVERA (2002) afirma que a morfina é droga mais usada, proporcionando até quatro horas de efeito analgésico. TREICHEL (2014) também utilizou o mesmo analgésico não relatando nenhum efeito deletério nos animais. Neste estudo optamos em utilizar cloridrato de tramadol, como nos três primeiros dias de pós-operatório pela duração do seu efeito analgésico e segurança em relação a morfina, semelhante a BAUNGARTEN et al. (2007), os quais também utilizaram cloridrato de tramadol como analgésico após realização de blefaroplastia em coelhos.

Em ambos os grupos tratados, em todos os períodos de avaliação, nenhum animal apresentou sinais de infecção no período pós-operatório. O comportamento dos coelhos foi normal, no que diz respeito a alimentação, ingestão de água e volume de fezes, bem como movimentação na gaiola. A apresentação clínica dos animais no período pós-operatório foi confirmada pelo leucograma, que não apresentou diferenças significativas entre os períodos pré e pós-operatórios e entre os grupos tratados (GCi e GCe), mantendo a contagem leucocitária dentro dos limites normais para a espécie. Em relação ao volume de urina, até as 72 horas após a cirurgia eram evidenciadas hematuria e oligúria, normalizando após este período. Optou-se pela utilização apenas de antibioticoprofilaxia, com ampicilina sódica 30 minutos antes do início do procedimento cirúrgico, pela veia auricular caudal da orelha. COUTO (2002) afirma que a ampicilina é particularmente tóxica para o coelho, porém, não se verificou nenhuma reação adversa em decorrência do uso do medicamento. FONSECA et al. (2006) utilizaram ampicilina sódica como terapia antibiótica profilática em coelhos para ablação dos bulbos olfatórios, na mesma dose deste estudo, não relatando nenhum efeito adverso nos animais em que utilizaram o antibiótico. GOMES et al. (2010), reconstruindo falhas mandibulares em coelhos, também fizeram uso do mesmo antibiótico e não relataram nenhum tipo de efeito adverso ou toxicidade relacionado ao seu uso em dose única anteriormente ao procedimento cirúrgico.

A maioria dos exames laboratoriais realizados neste experimento não sofreu variação entre os períodos pré e pós-operatório. A bioquímica sérica (renal e hepática) mostrou-se dentro do padrão fisiológico de referência para a espécie. O único parâmetro que variou foi a ureia, no subgrupo avaliado aos 15 dias, neste caso, houve diferença significativa entre GCi e GCe (Figura 1). No entanto, verificou-se que os valores desta variável já estavam elevados antes dos procedimentos cirúrgicos, inclusive acima dos valores normais de referência para a espécie. Já a creatinina sofreu algumas variações significativas, porém, sempre manteve-se nos limites fisiológicos, como demonstrado em um dos artigos acima. Segundo EMANUELLI et al. (2008), os níveis sanguíneos de ureia constituem uma indicação da função renal e podem servir como índice da taxa de filtração glomerular, porém, teoricamente, a creatinina é mais indicada, pois a quantidade de creatinina presente nos rins é mais constante e não é reabsorvida nos túbulos renais, como a ureia. Adicionalmente, as taxas de creatinina não sofrem variações de acordo com a dieta do animal, hemorragias gastrintestinais, etc. A fosfatase alcalina (FA) também apresentou muitas alterações em seus valores, demonstrando diferenças significativas entre o GCi e GCe, concordando com os resultados encontrados por EMANUELLI et al. (2008). Porém, apenas aos 30 dias do GCi apresentou-se acima do limite para a espécie. Segundo ÖZKAN et al. (2012), a atividade da FA sérica provém do fígado e dos ossos e varia de acordo com a idade, em indivíduos jovens os níveis séricos de FA são mais elevados devido ao crescimento ósseo rápido. Os animais deste estudo eram adultos, por isso, poderia-se atribuir o aumento pelo uso de ciclosporina. Segundo REZZANI (2006), a ciclosporina estimula a produção de TGF- $\beta$  pelo organismo, sendo esta responsável por lesões hepáticas e renais, estimulação de células neoplásicas, imunossupressão e doenças cardíacas. Porém, de acordo com MORINI (2005), em um estudo com cães, a utilização de ciclosporina não determinou alteração nas concentrações séricas de FA.

ALT	GCi	GCe	p-valor*
PO	26,67 ± 8,59	41,20 ± 12,82	0,04
15D	37,20 ± 11,63	26,33 ± 5,82	0,07
p-valor*	0,12	0,03	
PO	45,67 ± 11,27	40,30 ± 22,00	0,61
30D	41,50 ± 16,50	44,07 ± 25,02	0,84
p-valor*	0,62	0,79	

AST	GCi	GCe	p-valor
PO	36,65 ± 12,80	19,97 ± 11,28	0,04
15D	26,34 ± 5,17	17,51 ± 3,94	0,01
p-valor	0,10	0,63	
PO	43,53 ± 14,85	19,43 ± 5,94	0,00
30D	37,80 ± 22,48	21,64 ± 5,03	0,12
p-valor	0,61	0,50	

FA	GCi	GCe	p-valor
PO	102,48 ± 30,26	30,18 ± 7,59	0,00
15D	98,57 ± 28,39	39,36 ± 14,93	0,00
p-valor	0,82	0,21	
PO	99,65 ± 37,98	38,78 ± 11,57	0,00
30D	124,67 ± 45,80	43,58 ± 16,42	0,00
p-valor	0,33	0,57	

Ureia	GCi	GCe	p-valor
PO	50,78 ± 10,14	34,89 ± 14,20	0,04
15D	50,51 ± 9,53	35,45 ± 9,54	0,02
p-valor	0,96	0,94	
PO	47,33 ± 5,00	43,20 ± 5,09	0,19
30D	46,53 ± 14,46	58,09 ± 22,04	0,31
p-valor	0,90	0,14	

Figura 1 – Demonstração dos valores pré (PO) e pós-operatórios (15D e 30D) de ALT, AST, FA e Ureia, com os desvios-padrão e valores de p ( $p < 0,05$ ) em coelhas Nova Zelândia submetidas a alotransplante parcial de vesícula urinária.

No aspecto macroscópico das vesículas urinárias foram verificados, na maioria dos animais de ambos os grupos, espessamento parietal na área de sutura do enxerto, aderências da sutura do enxerto com estruturas adjacentes e boa integração do enxerto com o tecido vesical receptor, sem sinais de rejeição, corroborando com os resultados encontrados por DALECK et al. (1989), OLIVEIRA et al. (2008) e OLIVEIRA (2008). Na maioria dos coelhos, em ambos os períodos de observação, foram encontradas aderências da sutura do implante com mesentério, alça intestinal, mesométrio, sutura muscular abdominal e ligamento médio ventral da bexiga. No GCe todos os animais apresentaram aderência com alguma(s) das estruturas citadas acima. OLIVEIRA et al. (2008) também observaram em seu estudo com coelhos Nova Zelândia que, em todos os períodos de observação, havia aderências da região do implante com o peritônio parietal da parede ventral do abdome. Segundo PINTO FILHO et al. (2013) o omento melhora a irrigação, o aporte de células de defesa, a drenagem linfática, além de reduzir o espaço morto e providenciar células-tronco para a superfície lesionada.

Adicionalmente, de acordo com COLOMÉ et al. (2006), a omentalização também diminui a incidência de extravazamento pós-operatório no local de sutura e previne aderências com outros órgãos. Por isso, no caso deste estudo, a omentalização poderia ter evitado as aderências, porém, preferiu-se não utilizá-la a fim de não interferir com a cicatrização e assim ter uma avaliação mais fidedigna do efeito das células. As aderências foram a única complicação observada em decorrência da não utilização da omentalização neste experimento.

A média da viabilidade celular durante o cultivo celular no atual estudo foi de  $95.1\pm 2.79\%$ , valor bastante elevado se comparado com os  $88.7\%$  encontrado por BARRETO et al. (2014), os quais também estudaram características das ADSCs de coelhos Nova Zelândia.

No presente estudo, para marcação positiva foram utilizados os anticorpos anti-CD105, anti-CD90 e anti-CD73; para a marcação negativa utilizou-se o anti-CD45, todos de humano. Não encontramos nenhum anticorpo específico para uso em células de coelho, porém, não quer dizer que não haja tal reação quando colocados em contato.

Segundo a International Society for Cellular Therapy, são três os requerimentos mínimos para uma população de células possa ser classificada como MSC. A primeira é que MSCs são isoladas de uma população de células mononucleares com base à sua aderência seletiva, em cultura, à superfície do plástico. A segunda é que as expressões de CD105, CD73 e CD90 estejam presentes, e que CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR não sejam expressos em mais de 95% das células em cultura. Por fim, que as células possam ser diferenciadas em osso, gordura e cartilagem (BYDŁOWSKI et al., 2009). No estudo atual, foi verificada a aderência celular ao plástico das garrafas de cultivo, durante o período do mesmo; durante este período também se verificou morfologia celular fibroblástica (Figura 2A), mais uma característica necessária, segundo a literatura, para a comprovação de que trabalhamos com CTMs (BYDŁOWSKI et al., 2009; TORRES, 2009;

MONTEIRO et al., 2010; CARVALHO et al., 2013; XU et al., 2014). Quanto ao tamanho e granulosidade, foi verificada uma população celular homogênea (Figura 2B), concordando com os resultados obtidos por TORRES (2009), caracterizando também células derivadas do tecido adiposo de coelhos.

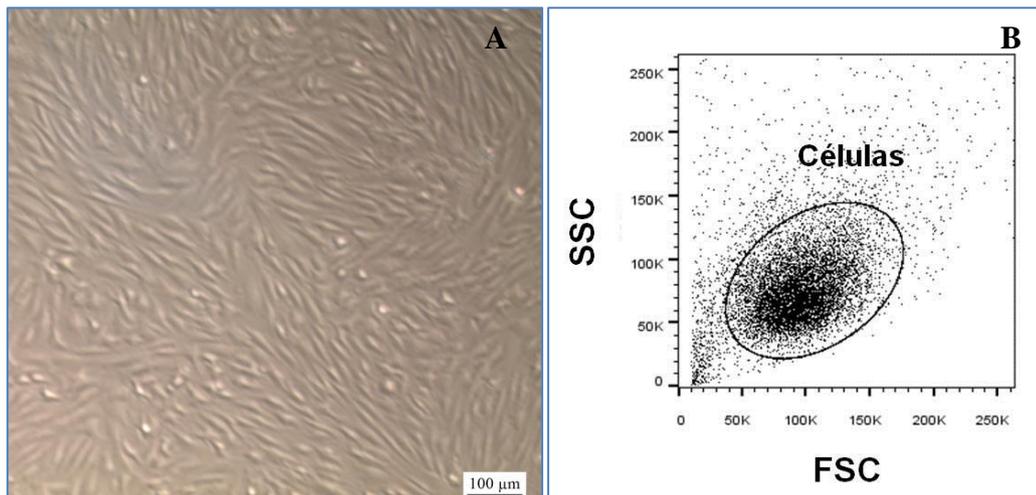


Figura 2 – CTMs derivadas do tecido adiposo de coelhos. Observar morfologia fibroblastóide aos 10 dias de cultivo (A). Seleção por tamanho e granulosidade celular (B). Observar homogeneidade da amostra em relação a estas características.

Pela espécie utilizada, não foram encontrados anticorpos específicos para os marcadores de superfície, por isso foram utilizados os citados acima. Assim, a citometria de fluxo revelou que, quando avaliados juntamente os CDs positivos 90 e 105 e o negativo CD45, 62,7% das células mostraram-se positivas para as duas primeiras proteínas de superfície e negativas para a última, conforme esperado quando se fala em CTM; também foi verificada positividade de 60,5% das células par o CD73 (Figura 3). Embora já tenham sido identificados oito marcadores de superfície para identificação de MSC, a International Society for Cellular Therapy concorda que apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, quando não estiverem expressos marcadores hematopoiéticos (CD45, por exemplo), é suficiente para a imunofenotipagem dessas células (MONTEIRO et al., 2010), conforme ocorrido neste estudo. A citometria de fluxo revelou que há reação cruzada entre humanos e

coelhos, conforme também verificado no estudo de CARVALHO et al. (2013), utilizando ADSCs de equinos. Por problemas técnicos no laboratório não foi possível a realização da diferenciação nas três linhagens citadas pela literatura.

No presente estudo, observações clínicas e exames complementares revelaram que os animais tratados com as ADSCs alogênicas não demonstraram sinais de rejeição aos enxertos durante até 30 dias de observação. Segundo CAPLAN (2007) estes efeitos imunomoduladores inibem fortemente o reconhecimento e expansão de células T pela inibição do TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , aumentando os níveis de IL-10. Embora todos estes efeitos imunomoduladores ainda não tenham sido bem descritos, os dados disponíveis indicam claramente que as MSCs alogênicas podem ser utilizadas como agente terapêutico.

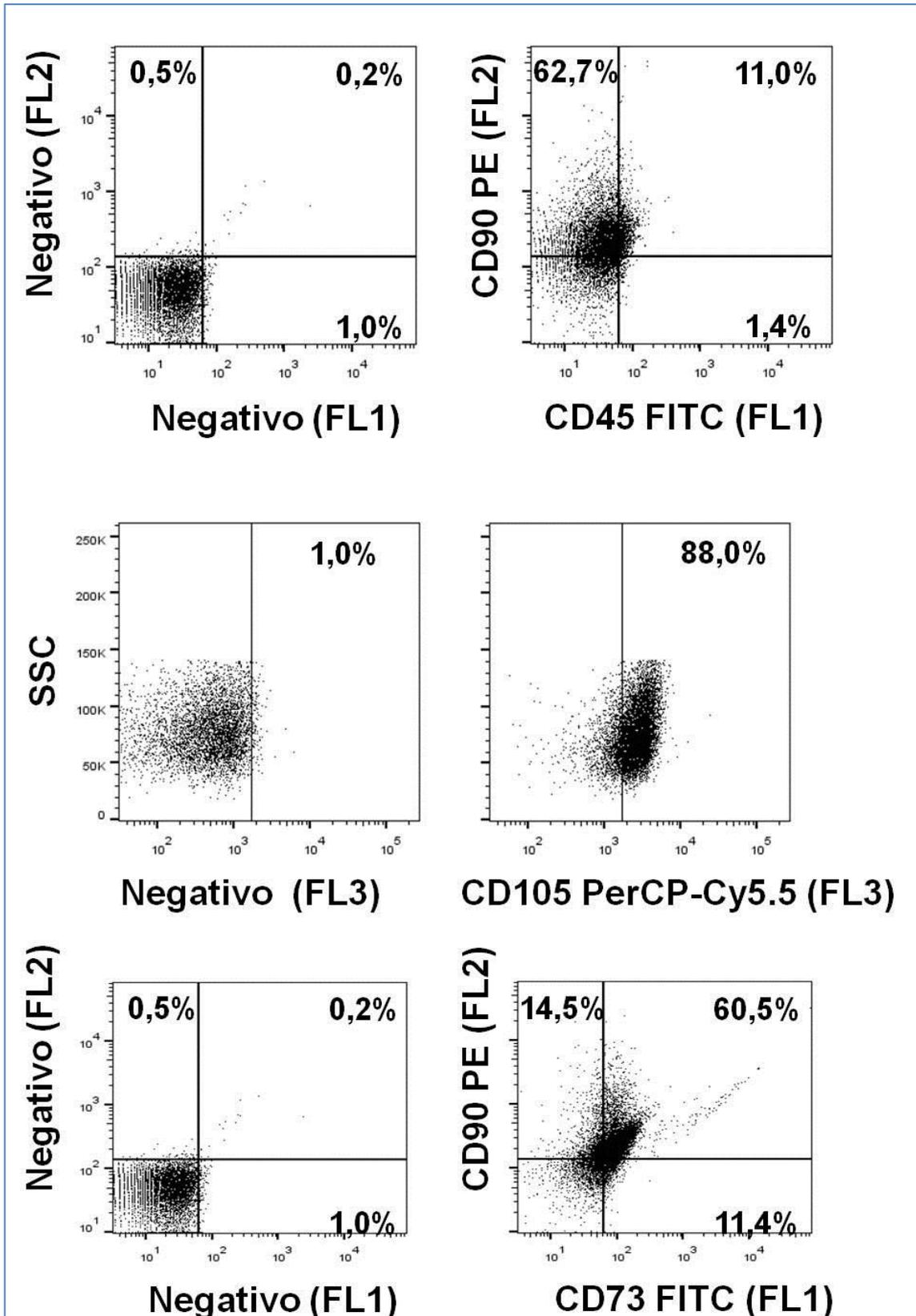


Figura 3 – Citometria de fluxo das CTMs derivadas do tecido adiposo de coelhos. Observar positividade para os CDs 73, 90 e 105 e negatividade para o CD45.

## 4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste experimento pode-se concluir que:

1. Houve maior número de animais com cálculo vesical no grupo tratado com ciclosporina, sendo cálcio o mineral mais prevalente em ambos os grupos. A urinálise revelou que os animais tratados com CTM não demonstraram hematúria e/ou bacteriúria.
2. As ADSCs, em única aplicação, foram suficientes para evitar sinais clínicos e ecográficos de rejeição ao aloimplante de vesícula urinária, mantendo a estrutura anatomofisiológica vesical por até 30 dias em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETO, L.S.S. et al. Cell kinetics, DNA integrity, differentiation, and lipid fingerprinting analysis of rabbit adipose-derived stem cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v.50, p.831-839, 2014.

BAUNGARTEN, L.B. et al. Blefaroplastia em coelhos por meio de cartilagem auricular alógena conservada em solução saturada de NaCl. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1219-1223, 2007.

BIZERRA, A.F. et al. **Manual prático sobre usos e cuidados éticos de animais de laboratório**. São Paulo: Instituto Butantan, 2010. 164p.

BRANDT, F.T., et al. Transplante de bexiga. Estudo piloto. **Acta Cirúrgica Brasileira [serial online]**. 2004; 19(4). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>. Acesso em 10 abr. 2011.

BYDLOWSKI, S.P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.1, p.25-35, 2009.

CAPLAN, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v.213, n.2, p.341-347, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.21200/full>>. Acessado e: 08 out. 2014. doi: 10.1002/jcp.21200.

CARVALHO, A.M. et al. Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.4, p. 939-945, 2013.

COLOMÉ, L.M. et al. Intussuscepção jejunoileal dupla em um cão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, n.2, p. 225-228, 2006.

COUTO, S.E.R. Criação e manejo de coelhos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Org.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. cap. 12, p. 93-103.

EMANUELLI, M.P. et al. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, p.251-255, 2008.

FONSECA, E.T. et al. Ablação cirúrgica dos bulbos olfatórios em coelhos: modelo para estudos de patogenia de infecções por vírus neurotrópicos. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.544-549, 2006.

GOMES, C. et al. Modelo experimental de reconstrução em falha mandibular em coelhos. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1597-1602, 2010.

MONTEIRO, B.S. et al. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n.1, 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782010000100040&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010000100040&lng=pt&nrm=iso). Acesso em 30 mar. 2011.

MORINI, A.C. **Efeitos da ciclosporina A sobre a função renal e hepática de cães da raça Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular**. 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MOTA, A.C.A., *et al.* Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares – perspectiva do hematologista. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 27, n.2, p.126-132, 2005.

OLIVEIRA, T.C. et al. Cistoplastia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com peritônio bovino conservado em glicerol a 98%. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2218-2224, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000800020>>. Acessado em: 01 jun. 2013. doi: 10.1590/S0103-84782008000800020.

ÖZKAN, C. et al. Normal values of haematological and some biochemical parameters in serum and urine of New Zealand White rabbits. **World Rabbit Science**, v.20, p.253 – 259, 2012.

PERS, Y.M.; JORGENSEN, C. Mesenchymal Stromal Cells: Updates and Therapeutic Outlook in Rheumatic Diseases. **Journal of Clinical Medicine**, v.2, p.201-213, 2013.

PINTO FILHO, S.T.L. et al. Ressecção de cisto e abscesso renais por laparoscopia em um cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1651-1656, 2013.

REZZANI, R. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. **Histology and Histopathology**, v.21, p.301-316, 2006.

RIVERA, E.A.B. Anestesia em animais de experimentação. In: ANDRADE et al. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002, cap.28, p.255-262.

SEMEDO, P. et al. Papel imunossupressor e remodelador das células-tronco mesenquimais em um modelo experimental de doença renal crônica. **Einstein**, v. 7, n.4, p. 469-479, 2009. Disponível em: <[http://apps.einstein.br/revista/arquivos/PDF/1431-Einsteinv7n4p469-79\\_port.pdf](http://apps.einstein.br/revista/arquivos/PDF/1431-Einsteinv7n4p469-79_port.pdf)>. Acessado em: 10 nov. 2013.

TEIXEIRA, M.W. **Alo-transplante parcial de bexiga em cães (*Canis familiaris*): avaliação clínica, histológica e imunoistoquímica**. 2007. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

TEIXEIRA, M.W., et al. Avaliação clínica e histopatológica de alo-transplante de bexiga em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p. 350-357, 2007.

TORRES, F.C. **Panículo adiposo interescapular de coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como fonte de células-tronco**. 2009. 107f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

TREICHEL, T.L.E. **Contribuições para o uso de células estromais mesenquimais no reparo de feridas cutâneas e no transplante de pele em coelhos**. 2014. 93 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

XU, N. et al. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells promotes the survival of venous-congested skin flaps in rabbit ear. **Cell Biochem Biophys**, online, 2014.

YANG, S. et al. Experimental bladder defect in rabbit repaired with homologous bladder extracellular matrix graft. **Chinese Medical Journal**, Beijing, v.118, n.11, p.957-960, 2005.

YARAK, S.; OKAMOTO, O.K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, p.647-656, 2010.