



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

GLAYCIANE BEZERRA DE MORAIS

**CORRELAÇÃO DA FIBROSE RENAL COM EXPRESSÃO DE
ALFA-SMA, VIMENTINA E TGF-BETA NO GATO COM
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

FORTALEZA

2013

GLAYCIANE BEZERRA DE MORAIS

**CORRELAÇÃO DA FIBROSE RENAL COM EXPRESSÃO DE
ALFA-SMA, VIMENTINA E TGF-BETA NO GATO COM
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientadora: Profa. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista.

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho
Bibliotecário (a) Leila Cavalcante Sátiro – CRB-3 / 544

M827c Morais, Glayciane Bezerra de.
Correlação da fibrose renal com expressão de alfa-SMA, vimentina e TGF-beta no gato com doença renal crônica / Glayciane Bezerra de Morais. — 2013.
CD-ROM 60f. : il. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista.

1. Fibrose renal. 2. Gato. 3. Miofibroblastos. I. Título.

CDD: 633

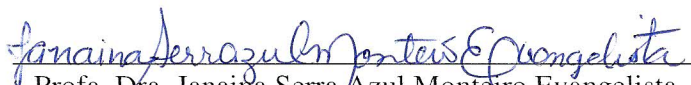
GLAYCIANE BEZERRA DE MORAIS

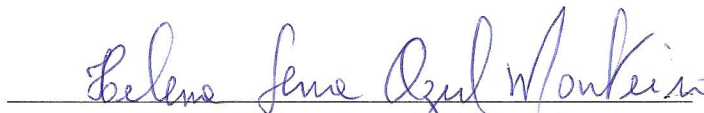
**CORRELAÇÃO DA FIBROSE RENAL COM EXPRESSÃO DE
ALFA-SMA, VIMENTINA E TGF-BETA NO GATO COM
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

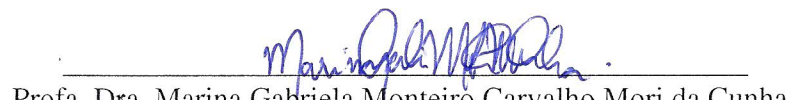
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 12 / 07 / 13

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora


Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Universidade Federal do Ceará
Examinadora


Profa. Dra. Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

*Dedico este trabalho aos meus bichanos por
todo o carinho dispensado a mim e por serem
a fonte inesgotável da minha busca incansável
em progredir no conhecimento.*

*“Tu és o Autor da vida
E eu, a Tua canção
Tu és o oleiro
E eu, barro em Tuas mãos
Tu és o instrumentista
E eu, soprado por Ti
Tu és o artista
E eu me rendo a Ti
Toca-me, canta em mim
Põe as cores que há em Teus olhos sobre mim
Move-me, sente em mim
Conta a Tua história através de mim
Tu és o Autor da vida
E eu, a composição
Tu és o artista
E a tela é o meu coração”*

Ana Paula Valadão Bessa

AGRADECIMENTOS

A Deus, o autor e consumidor da minha fé, presença constante na minha vida e motivo da minha existência. Senhor, eis aqui as minhas mãos, tudo o que eu tenho, tudo o que eu sou vem de Ti, e eu quero que seja devolvido a Ti. Que cada fôlego de vida meu seja para Tua glória.

À Universidade Estadual do Ceará, à Faculdade de Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias por terem propiciado subsídio físico, estrutural e intelectual para minha formação e a realização deste projeto.

À Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa, FUNCAP, pelo auxílio financeiro disponibilizado, sem o qual não seria possível a execução deste projeto.

Ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem da Universidade federal do Ceará pelo subsídio físico para os experimentos de imunohistoquímica.

À minha orientadora Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista, por todo o aprendizado, confiança e oportunidades a mim dispensados, a quem tenho eterna gratidão, respeito, estima e referência como mestre.

Ao prof. Daniel de Araújo Viana por todo aprendizado e atenção a mim dispensados. Apenas palavras não poderiam descrever a minha tão grande gratidão e admiração.

À profa. Gerly Anne por ter disponibilizado seu conhecimento e laboratório para a execução dos experimentos de imunohistoquímica.

Aos meus pais pelo dom da vida. Em especial à minha mãe Rosa Bezerra, minha eterna inspiração, fonte de amor e dedicação.

À minha tia Ana Bezerra Valentin, pelo cuidado, amor e dedicação.

Ao meu irmão Antônio Carlos de Moraes Filho (Bil).

À querida amiga Karine Monteiro pela sua doce amizade, sendo fonte inspiradora para as minhas decisões. Obrigada por ter cuidado de mim e me ajudado a alcançar vãos cada vez mais altos em busca dos meus sonhos.

Ao meu querido amigo e Médico Veterinário, Gustavo Fernandes Viana, por dividir todas as angústias, sonhos e aprendizado durante a execução deste trabalho.

Ao grande mestre médico veterinário Luis Lima Filho (*in memoriam*) por todo incentivo e aprendizado sempre.

Aos meus amigos de turma do Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, companheiros de jornada, lutas, experimentos e conquistas e em especial ao meu amigo Igor Ciríaco Barroso.

A todos os mestrandos, alunos de iniciação científica e colaboradores do Laboratório de Histologia dos Efeitos Provocados por Venenos de Serpentes e Plantas (HISTOVESP), que me auxiliaram nos experimentos deste trabalho de forma direta ou indireta.

Ao corpo funcional do laboratório de análises clínicas veterinária Pathovet por toda atenção a mim dispensada.

Ao estimável aluno de iniciação científica, Francisco Antônio Félix Xavier Júnior, por sua tão grande abnegação, disponibilidade e colaboração na execução deste projeto, sendo companhia nos momentos de dificuldade e trabalho.

À querida Josiane por toda atenção dispensada e aprendizado.

Ao Alceu por todo profissionalismo e brilhante trabalho na histopatologia.

As queridas proprietárias Lana Bastos e Raquel Gois, que mesmo em meio a um momento de profunda dor pela perda do seu estimável bichano (Ronaldo), optaram por acreditar no meu trabalho em prol de algo maior, o conhecimento.

Aos meus bichanos Memê, Rock, Lulico, Hugo Augusto, Milunga, Minie, Rosinha, Florzinha, Carolina, Memê, Milica, Nica, Nice, Loirinho, Dré, Felícia, Junin, Bia, Belinha, Mel, Nilo, Vivi e aos meus preciosos e inseparáveis cachorros Kaboko e Mozart, fiéis companheiros de jornada, fonte de inspiração, de amor, de fidelidade e de realização. Sem eles minha existência não seria a mesma e não haveria motivos para estudar e prosseguir em conhecer.

Ao querido paciente felino Ronaldo, o gato mais doce e admirável que pude acompanhar durante a execução deste projeto. Apesar de ter sido tão breve a nossa convivência, ele foi uma grande inspiração para este trabalho e um grande aprendizado para mim, me ensinando a respeitar a decisão de desistir dos esforços diante da hora da despedida.

A todos os proprietários e aos queridos pacientes que se doaram em vida para que por meio destas o conhecimento e ensino fossem proporcionados a mim.

Sou profunda e eternamente grata a todos!

RESUMO

A doença renal é a enfermidade mais frequentemente diagnosticada em animais de companhia. A doença renal crônica (DRC) é definida pela presença de alterações estruturais ou funcionais em um ou ambos os rins, presentes durante um período prolongado. Nos gatos, a severidade da DRC é predominantemente mediada pelo dano tubulointersticial, particularmente por fibrose intersticial, associada a células produtoras da matriz extracelular e pela indução e proliferação de miofibroblastos. Diante disto, objetivamos verificar a correlação da alfa actina de músculo liso (α -SMA), vimentina e fator de crescimento transformante beta (TGF- β) em secções de rins de gatos com DRC mediante a técnica de *tissue microarray*, bem como entre o estadiamento da doença pela dosagem de creatinina sérica, segundo a *International Renal Interest Society* (IRIS), com os achados histopatológicos e a participação de miofibroblastos na progressão da DRC em gatos. Foram coletados fragmentos de rins, após óbito natural, de 10 gatos diagnosticados com DRC. Estes fragmentos foram desidratados, diafanizados e cortados para confecção de lâminas para histopatologia e imunohistoquímica. A expressão de α -SMA, vimentina e TGF- β foi avaliada semiquantitativamente e correlacionada com os valores de creatinina plasmática (Pcre). Os resultados demonstraram que foram significativas as correlações de Pcre com α -SMA intersticial, vimentina tubular e TGF- β glomerular e tubular. Houve correlação significativa entre todos os parâmetros histológicos (Glomeruloesclerose, infiltrado celular e fibrose intersticial). A correlação entre a fibrose intersticial e a marcação de α -SMA intersticial e infiltrado celular e TGF- β nos mostra a presença de miofibroblastos e nos leva a concluir que estas células desempenham papel importante na fibrose intersticial e consequente progressão da doença em gatos.

Palavras chave: Fibrose renal. Gato. TGF- β . Miofibroblastos

ABSTRACT

Kidney disease is a disease most often diagnosed in pets. Chronic kidney disease (CKD) is defined by the presence of structural or functional abnormalities in one or both kidneys, present over a prolonged period. In cats, the severity of CKD is predominantly mediated by tubulointerstitial damage, particularly interstitial fibrosis associated with extracellular matrix-producing cells and the proliferation and myofibroblast induction. Given this, we aimed to investigate the correlation of alpha smooth muscle actin (α -SMA), vimentin, and transforming growth factor beta (TGF- β) in sections of kidneys of cats with CKD by techniques of tissue microarray as well as between staging of disease by serum creatinine, according to the International Renal Interest Society (IRIS), with histopathologic findings and involvement of myofibroblasts in the progression of CKD in cats. Kidney fragments were collected after natural death of 10 cats diagnosed with CKD. These fragments were dehydrated, and diaphanous cut to prepare the slides for histopathology and immunohistochemistry. The expression of α -SMA, vimentin and TGF- β was evaluated semiquantitatively and correlated with plasma creatinine values (Pcre). The results showed that there were significant correlations Pcre with interstitial α -SMA, vimentin and TGF- β glomerular and tubular. There was a significant correlation between all histological parameters (glomerulosclerosis, cellular infiltration and interstitial fibrosis). The correlation between interstitial fibrosis and marking of α -SMA and interstitial cellular infiltration and TGF- β shows the presence of myofibroblasts and leads us to conclude that these cells play an important role in interstitial fibrosis and subsequent progression of the disease in cats.

Keywords: Renal fibrosis. Cat. TGF- β . Myofibroblasts

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figure 1 Photomicrograph of cat kidney with chronic kidney disease stage 3. The glomerulus shows thickening of the parietal sheet of Bowman's capsule with marked sclerosis and capsular fibrosis. Picrosirius red, 400x increase 47
- Figure 2 Photomicrographs of cat kidney with chronic kidney disease stage 3. (A): Segments of tubules with degeneration presenting irregular thickening and segmentation of tubular basement membrane (Black arrow). Stained with Methenamine silver periodic acid, 400x. (B): Interstitial inflammatory infiltrate with severe and exuberant interstitial fibrosis. Stained with Picrosirius red, 100x (Black arrow)..... 48
- Figure 3 Immunohistochemistry for detection of α -AML, vimentin and TGF- β 1/2 in cat kidney with chronic kidney disease. (A): α -AML. The region of the interstitium was heavily marked mainly in areas near fibrotic and inflammatory infiltrate rich. 400x. (B): Vimentin. The marking vimentin at tubular and interstitial tubules showing epithelial cells strongly marked and alternating tubular cells unmarked. 400x. (C): TGF- β 1/2. Interstitial segments moderately positive and discrete positive immunostaining at the level of inflammatory infiltrate. 400x 49
- Figure 4 Correlations between histopathological parameters of interstitial fibrosis, cellular infiltration and glomerulosclerosis with plasmatic creatinine (PCre). $P < 0,05$ 50

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1	Correlations between immunostaining for alpha smooth muscle (α -SML), vimentin and beta transformant growth factor (TGF- β 1/2) with plasmatic creatinine (PCre) and histopathological parameters	51
---------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA	Alfa actina de músculo liso
C5b-9	Complexo de ataque à membrana 5b-9
CISH	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica
DRC	Doença renal crônica
DTI	Dano tubulointersticial
ET-1	Endotelina-1
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
HE	Hematoxilina e eosina
IRIS	International Renal Interested Society
MEC	Matriz extracelular
MMPS	Metaloproteinases
MP-1	Metaloproteinase-1
MPI-1	Inibidor tecidual de metaloproteinase 1
NTI	Nefrite tubulointersticial
NTC	Nefrite tubular crônica
PAI-1	Inibidor de ativação de plasminogênio-1
PAS	Ácido periódico de Schif
TEM	Transição epitelial mesenquimal
TEndM	Transição endotelial mesenquimal
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta-1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Aspectos relativos à morfologia e doença renal em felinos	16
2.2 Aspectos relativos à progressão da doença renal crônica em felinos	18
2.3 Aspectos relativos à ação de fibroblastos/miofibroblastos com a progressão do dano tubulointersticial e fibrose intersticial na doença renal crônica	20
2.4 Aspectos relativos ao <i>Tissue microarray</i>	23
3. JUSTIFICATIVA	25
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA	27
5. OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo geral	28
5.2 Objetivos específicos	28
6. Capítulo 1 - Chronic kidney disease in cats: morphofunctional characterization of myofibroblasts immunoreactivity through <i>Tissue Microarray</i>.....	29
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
8. PERSPECTIVAS	53
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
10. APÊNDICE A	61

1. INTRODUÇÃO

Os rins desempenham um papel indispensável na homeostase e excreção de produtos terminais do metabolismo corporal animal (GUYTON & HALL, 2011). São também responsáveis pela dinâmica hídrica corpórea, equilíbrio ácido-básico, produção e regulação de hormônios, manutenção da pressão arterial e volemia, metabolismo do cálcio e eritropoese (REECE, 2006).

A doença renal é a enfermidade mais frequentemente diagnosticada em animais de companhia e a segunda causa de morte em gatos (SCHENCK & CHEW, 2010). É estimado que 1,6 a 20% da população de gatos desenvolva doença renal de forma crônica, podendo acometer gatos de todas as idades e mais frequentemente os geriátricos com idade superior a 7 anos e até 49% dos gatos com idade superior a 15 anos (ROSS et al. 2006; POLZIN et al. 2008; DIBARTOLA, 2009). Estima-se que a prevalência da doença renal crônica (DRC) espontânea em gatos idosos seja três vezes mais alta que em cães idosos (POLZIN et al. 2008).

A doença afeta todas as raças de gatos, machos e fêmeas indistintamente (ELLIOTT & BROWN, 2004). Há poucos estudos sobre a sobrevivência de gatos afetados pela DRC, devido à imprevisibilidade da sua progressão e a variabilidade das apresentações clínicas (BOYD et al. 2008).

A DRC é definida como a presença de alterações estruturais ou funcionais em um ou ambos os rins que têm estado presentes durante um período prolongado, geralmente superior a 3 meses. A partir desta definição, a DRC pode ser caracterizada por um largo espectro de doenças, variando de uma pequena lesão estrutural em um único rim a extensa perda de néfrons que afetam ambos os rins (POLZIN, 2011). A doença é reconhecida pela presença de lesões micro ou macroscópicas nos rins que podem ser detectadas por meio de biópsia, exames de imagem ou marcadores bioquímicos através da análise de amostras séricas ou de urina (POLZIN et al. 2008).

A DRC é decorrente de lesões que promovem uma perda progressiva e lenta na função renal e alterações metabólicas adaptativas no rim levando a mecanismos compensatórios para manutenção da homeostase (SENIOR, 2001). A etiologia da DRC é heterogênea e numerosas causas foram identificadas como primárias ou secundárias (GRAUER, 2009). A doença renal primária é provocada por qualquer fator ou processo que origine lesão no rim. As doenças mais implicadas na etiologia da DRC incluem aquelas de natureza inflamatória (glomerulonefrites ou infecções bacterianas), metabólica (nefropatia

hipercalcêmica), hereditária (nefrite hereditária), hemodinâmica (nefropatia hipertensiva) e neoplásica (linfossarcoma renal) (BROWN, 1999).

Dentre as principais causas da DRC em gatos estão a urolitíase obstrutiva, rins policísticos, linfoma renal, pielonefrite e amiloidose. A nefrite tubulointersticial (NTI) é o achado mais frequente em biópsias e as doenças glomerulares são consideradas raras e pouco frequentes em gatos (SYME et al. 2006).

Em um estudo realizado por Minkus e Horauf (1994) com amostras de tecidos renais oriundas de biópsia ou necrópsia de 47 gatos com creatinina sérica elevada ($>2\text{mg/dL}$), a nefrite tubulointersticial crônica (NTC) estava presente em 70,4% das amostras, glomerulopatias em 14,8%, linfossarcoma maligno em 10,6% e amiloidose em 2,1%. O diagnóstico morfológico mais comum encontrado por DiBartola e colaboradores (1987) em gatos com DRC foi a NTC de causa desconhecida, caracterizada por lesões fibróticas com atrofia e perda dos túbulos renais, em 52,7% das 74 amostras analisadas.

O dano tubulointersticial (DTI) é importante para a progressão da DRC, independente dos insultos primários (YABUKI et al. 2010). Nos gatos, a severidade da DRC é predominantemente mediada pelo DTI, particularmente por fibrose intersticial, associada com células produtoras da matriz extracelular e indução e proliferação de miofibroblastos. Estas células são responsáveis por um papel importante na patogênese da fibrose tecidual e cicatrizes renais (GABBIANI, 1992; YABUKI et al. 2012).

Os miofibroblastos possuem características de células musculares lisas, entretanto, são células indistinguíveis de fibroblastos por microscopia de luz convencional, sendo a imunomarcagem uma ferramenta importante na identificação destas células em cortes de tecidos renais (IDE et al, 2001).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos relativos à morfologia e doença renal em felinos

No gato, ambos os rins são pendentes, móveis, e mais caudalmente localizados do que no cão. O rim direito felino é posicionado ao nível das vértebras L1 a L4 e o rim esquerdo a nível de L2 a L5. Os rins são desprovidos de demarcações lobulares externamente, apresentando uma superfície lisa encaixada dentro de uma cápsula fibrosa e elástica. Quando seccionando, o rim revela uma camada exterior de cor escura, altamente vascularizada, o córtex, em torno de uma camada com leve coloração, a medula (CLARKSON & FLETCHER, 2011).

Uma particularidade do rim felino é a presença de apenas um lobo sendo classificado como unilobar ou unipiramidal verdadeiro. Isso ocorre devido à fusão quase completa dos lobos de modo que os ápices das pirâmides formam uma espécie de papila comum em forma de crista, a crista renal, onde os ductos papilares drenam para a pelve renal (BROWN, 1987).

Os vários componentes anatômicos dos rins em gatos são funcionalmente interdependentes, de forma que danos em uma porção do néfron acarretarão invariavelmente danos progressivos em outras estruturas (STEVENATO, 2008).

A dificuldade na determinação da causa subjacente à DRC está intimamente associada a particularidades anatômicas, estruturas e fisiológicas do rim do gato e a três fenômenos relacionados com a evolução da doença renal progressiva, que são a interdependência no funcionamento dos componentes renais, as respostas morfológicas e fisiológicas dos tecidos que envolvem os rins, a diferentes agentes etiológicos, são limitadas e que após a maturação dos néfrons que ocorre por volta de um mês de idade no gato, não há renovação daqueles que já foram irreversivelmente destruídos pela doença. Deste modo, uma lesão inicialmente restringida a uma pequena porção, acabará por afetar, progressivamente, o rim remanescente (AMADOR, 2009).

Independentemente da reversão dos danos morfológicos, a recuperação da função renal é limitada porque as alterações estruturais nem sempre são acompanhadas por recuperação funcional (POLZIN et al. 2008).

As agressões renais que produzem diminuição da perfusão capilar glomerular geram atrofia das células epiteliais tubulares, degeneração e necrose. A reação de reparo tecidual que se sucede consiste na deposição de tecido fibroso não funcional, contribuindo para a diminuição do tamanho dos rins e da função renal (AMADOR, 2009). Com a doença em progressão, as alterações destrutivas de atrofia, inflamação, fibrose e mineralização dos néfrons afetados impostas pelos mecanismos compensatórios e adaptativos, tornam as manifestações da doença renal muito similares e conseqüentemente impossível a sua distinção (POLZIN et al. 2008; AMADOR, 2009).

Devido à interdependência dos componentes vascular e tubular do néfron, o ponto final dos danos glomerulares ou tubulares irreversíveis é o mesmo. Entretanto, o processo básico da doença pode afetar primariamente os glomérulos, os túbulos, o tecido intersticial ou a vasculatura renal (CAMARGO, 2002).

Distúrbios imunológicos, obstrução do fluxo urinário, inflamação, infecção, neoplasias e amiloidose induzem a diminuição do número de néfrons funcionais através de

alterações fisiopatológicas nestes segmentos do néfron (GRAUER, 2009). Qualquer condição em que exista destruição progressiva do tecido renal resultará em um quadro de insuficiência renal (IR), quando aproximadamente 2/3 ou 3/4 dos néfrons de ambos os rins estiverem afunccionais. O estágio final da doença é caracterizado morfolologicamente por marcada fibrose glomerular, intersticial e atrofia tubular (GRAUER, 1994a; CAMARGO, 2002).

O dano tubulointersticial, e não glomerulopatia, é reconhecido por desempenhar um papel crítico na progressão final de DRC culminando em estágio terminal principalmente em gatos (YABUKI et al. 2010). A prevalência de DTI é independente dos insultos primários e induzido por proteinúria maciça ou hipóxia crônica, gerando uma diminuição na taxa de filtração glomerular (TFG), através de insuficiência do sistema de *feedback* tubuloglomerular e obliteração dos capilares pós-glomerulares, levando à falência renal (NANGAKU, 2002; 2004; YABUKI et al. 2010).

As alterações patológicas envolvidas no DTI incluem infiltração de células mononucleares, lesão tubular e fibrose intersticial (KELLY & NEILSON, 1996). A fibrose intersticial é uma característica típica de DTI. Em humanos a perda de função renal é fortemente correlacionada com o DTI (NANGAKU, 2002).

A fibrose renal pode ocorrer como evento primário, resultante da formação de colágeno mesangial ou endotelial (KOEMAN et al. 1994), mas frequentemente ocorre como manifestação crônica na fase de cicatrização da lesão renal pré-existente (CONFER e PARCIERA, 1998).

2.2 Aspectos relativos à progressão da doença renal crônica em felinos

Tradicionalmente, os termos doença renal, insuficiência renal e falência renal têm sido usados indiscriminadamente (BROWN, 1999). Na literatura é sugerida uma revisão destes termos, uma vez que doença renal não é sinônimo de falência ou insuficiência renal. Recentemente foi proposto que o termo doença renal deve ser utilizado em detrimento ao termo insuficiência renal (ROUDEBUSH et al. 2009; FREITAS, 2010).

Consoante a quantidade de parênquima renal afetado, a severidade e a duração das lesões, a doença renal pode, ou não, conduzir a falência renal e caracterizada como crônica. Assim, a falência renal consiste numa disfunção orgânica e não em uma patologia específica (POLZIN et al. 2008).

A doença renal é definida como a presença de alterações funcionais e estruturais em um ou ambos os rins. É caracterizada pela redução da função renal ou pela presença de lesões renais (FREITAS, 2010).

Barber (2004) descreve a falência renal como sendo a incapacidade do rim efetuar qualquer uma das suas funções normais. Semelhantemente a falência renal, o termo insuficiência renal implica em disfunção renal, embora a um nível menos severo podendo apresentar azotemia e frequentemente uremia (POLZIN et al. 2008). O termo insuficiência é também usado quando o funcionamento do rim está comprometido ao ponto de ultrapassar a capacidade da reserva renal (BARBER, 2004). Nesta fase, ocorre perda da capacidade de concentração de urina e a manifestação dos sinais clínicos sistêmicos de falência renal, como a síndrome urêmica (POLZIN et al. 2008).

O termo doença renal se refere a processos que afetam gradualmente múltiplas funções que se perdem progressivamente com a severidade da doença (BARBER, 2004). Salienta-se que o funcionamento adequado do rim não é o sinônimo de função renal normal, pois o rim consegue manter uma homeostase adequada, mesmo sem a totalidade de néfrons funcionais (POLZIN et al, 2008).

A “International Renal Interest Society” (IRIS) propõe um sistema de classificação para a doença renal, reconhecido internacionalmente, que a categoriza em quatro estádios consoante parâmetros definidos, com o objetivo de facilitar a aplicação de orientações clínicas adequadas para o diagnóstico, tratamento e prognóstico da doença renal em pequenos animais (IRIS, 2009a). A IRIS propõe a utilização do termo doença renal crônica, em detrimento do termo insuficiência renal crônica, com o objetivo de aproximar a terminologia veterinária a que é correntemente utilizada em medicina humana (ELLIOTT & WATSON, 2009).

A DRC é caracterizada por lesões estruturais progressivas, que resultam na descoordenação entre as funções de excreção, síntese e regulação renais. Em cães e humanos, a DRC é progressiva e irreversível, conduzindo à morte num período de meses a anos após o diagnóstico inicial (AMADOR, 2009).

A DRC espontânea em gatos é também progressiva, embora com a evolução mais variável e podendo alternar longos períodos de função renal clinicamente estáveis (ROSS et al. 2006).

A importância do compartimento tubulointersticial na doença renal progressiva é suportado pela evidência de que a gravidade das mudanças tubulointersticiais, incluindo a atrofia tubular, infiltrado intersticial e fibrose, de perto se assemelha a um declínio da função renal (ROSSINI & FOGO, 2004).

A nefrite tubulointersticial (NTI) se configura como o diagnóstico morfológico mais implicado na DRC e o mais prevalente em gatos consequente ao DTI (MINKUS &

HORAUF, 1994).

2.3 Aspectos relativos à ação de fibroblastos/miofibroblastos com a progressão do dano tubulointersticial e fibrose intersticial na doença renal crônica

Fibroblastos modificados, miofibroblastos, são responsáveis pela geração de MEC, cuja superprodução pode levar a esclerose renal. Estas células possuem características de ambos, fibroblastos e células musculares lisas, e estão intimamente envolvidas, não só na retração da ferida e cicatrização, mas também na fibrose tecidual de vários órgãos, incluindo o rim (GABBIANI, 1992).

Morfologicamente, os miofibroblastos são extremamente variáveis e heterogêneos em contraste com os fibroblastos quiescente normais. Miofibroblastos típicos contêm abundante retículo endoplasmático rugoso (KAISLING & LE HIR, 2008) e podem ser derivados da migração da região perivascular (WIGGINS et al. 1993), proliferação local de uma população de células residentes (HEWITSON & BECKER, 1995), do recrutamento de precursores pelo sangue (GRIMM et al. 2001), da transformação de ambos os epitélios dos túbulos e das células endoteliais através da transição epitelial mesenquimal (TEM) (LIU, 2004; SAM et al. 2006) e da transição endotelial mesenquimal (TEndM) (ZEISBERG et al. 2008), respectivamente.

A fibrose intersticial renal é a etapa final de uma sequência de processos inflamatórios crônicos que sucedem a uma lesão tecidual no rim (IDE et al, 2001).

O processo de fibrose tecidual envolve um complexo processo patológico que requer a participação de várias células inflamatórias e o acúmulo anormal de matriz extracelular (MEC) (KLIEM et al. 1996).

Esclerose (ou fibrose) está associada com as atividades de células mesenquimais (BECKER et al. 2001). O fibroblasto intersticial, célula mesangial glomerular e célula do músculo liso vascular são células fenotipicamente semelhantes, com o fibroblasto e célula mesangial adquirindo características de músculo liso quando ativadas (ALPERS et al. 1992; HEWITSON & BECKER, 1995).

A progressão da doença renal depende, dentre outros fatores, da interação entre células do rim e citocinas (EDDY, 1996). As citocinas atuam sobre as células renais (células tubulares, células mesangiais e fibroblastos) na indução de proliferação e modificação de seus fenótipos. Estas células, principalmente fibroblastos, começam a expressar α -actina de músculo liso (α -SMA) e aumentar a produção de colágeno e outros componentes da matriz extracelular (HOWIE et al. 1995; ZHANG et al. 1995).

Na TEM, as células epiteliais adquirem características de células mesenquimais, perdendo a polaridade e o contato célula a célula, passando por remodelação dramática do citoesqueleto. Concomitante com a perda de adesão de células epiteliais e os componentes do citoesqueleto, estas células adquirem um perfil de expressão de células mesenquimais e fenótipo migratório (HEWITSON, 2009).

A TEM renal, por definição, é um processo em que células tubulares renais perdem o seu fenótipo epitelial e adquirem características de fibroblastos, sendo particularmente significativo na patogênese da fibrose tubulointersticial que acompanha toda doença renal progressiva (LIU, 2004). A TEM ainda não foi comprovada *in vivo*, o que leva a se pensar que ela também ocorra em felinos.

O fibroblasto intersticial renal e miofibroblastos tem sido foco de estudos de fibrose tubulointersticial. Os miofibroblastos são reconhecidos pela sua expressão de α -SMA, característica em todas as formas de doença renal progressiva, fortemente correlacionada com a progressão da doença (HEWITSON & BECKER, 1995; JUNIANTITO et al. 2012).

A α -SMA e a proteína de filamento intermediário, vimentina, têm sido utilizadas como marcadores fiáveis para a identificação de miofibroblastos. Visto que não são expressas nos fibroblastos normais no rim (KAISLING & LE HIR, 2008; JUNIANTITO et al. 2012). A isoforma α -SMA é normalmente expressa por células musculares lisas vasculares, mas fibroblastos intersticiais e células mesangiais e tubulares também podem expressar esta proteína numa variedade de doenças glomerulares (GELEILETE et al. 2001).

Alguns estudos têm sugerido que os marcadores de ativação e proliferação de células renais, tais como α -SMA e antígeno nuclear de células (PCNA) podem ser úteis para o diagnóstico e/ou indicadores de prognóstico para doenças glomerulares (ZHANG et al. 1995; MUCHANETA-KUBARA & NAHAS, 1997).

A expressão de miofibroblastos renais e seu papel aparente no DTI tem sido demonstrada em vários tipos de nefropatias humanas (HEWITSON & BECKER, 1995; GOUMENOS et al. 2001). Estudos detalhados utilizando modelos de animais experimentais têm elucidado que o complexo mecanismo subjacente ao DTI envolve a indução e proliferação de miofibroblastos (BASCANDS & SCHANSTRA, 2005; ZOJA et al. 2006).

Em estudo realizado por Yabuki e colaboradores (2010) foi demonstrada a indução e proliferação de miofibroblastos na DRC em gatos com auxílio de α -SMA e vimentina como marcadores destas células. A expressão tubular de vimentina foi correlacionada significativamente com o grau de fibrose intersticial em gatos e a associação

entre α -SMA e a fibrose intersticial foi claramente estabelecida, demonstrando assim o papel dos miofibroblastos na fibrose intersticial e DTI como fator de gravidade na DRC em gatos.

Acredita-se que a fibrose tubulointersticial ocorra secundária a glomeruloesclerose e a isquemia resultante do segmento de néfron remanescente. No entanto, estudos recentes ilustram mecanismos primários de cicatrização progressiva do interstício tubular, incluindo a expressão tubular super regulada de citocinas e síntese de MEC, consequente de macrófagos infiltrantes e possível transdiferenciação epitelial-mesenquimal, resultando em um infiltrado intersticial pró-fibrótico (ROSSINI & FOGO, 2004).

Os macrófagos têm diversos papéis na lesão tecidual, mediando reparação e remodelação na fase inicial após uma lesão. No entanto, a persistência de macrófagos ativados é bem correlacionada com a fibrose progressiva no rim. Macrófagos produzem inúmeros fatores pró-fibróticos, incluindo o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), endothelina-1 (ET-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que induzem um aumento na síntese de matriz por células parenquimais residentes e o desenvolvimento de miofibroblastos (NG et al. 1998; EDDY, 2000; ROSSINI & FOGO, 2004). Eles também podem liberar inibidores de proteases de degradação da matriz, tais como inibidor tecidual de metaloproteinase-1 (MPI-1) e inibidor de ativação de plasminogênio-1 (PAI-1), aumentando as chances de formação da matriz extracelular (EDDY, 2001).

A maior parte da degradação colágeno no rim está sob o controle de metaloproteinases de matriz (MMPs) principalmente a metaloproteinase-1 (MP-1), uma família de endopeptidases zinco-dependente. Coletivamente, as MMPs são capazes de degradar todas as proteínas da MEC (HEWITSON, 2009).

O TGF- β tem sido implicado como uma molécula chave na fibrose e regulação imune, sendo que sua expressão é aumentada em numerosas condições fibróticas (MUNGER et al. 1999). Esse fator de crescimento facilita o acúmulo de matriz, por aumento da síntese de proteínas da matriz, pelo aumento da síntese de integrinas envolvidas na montagem da matriz da superfície celular e pela diminuição das metaloproteinases e aumento da síntese de proteinase, incluindo inibidores de PAI-1, diminuindo assim a degradação da matriz (ROSSINI & FOGO, 2004).

Evidências mais recentes sugerem que durante a injúria renal, células epiteliais tubulares são capazes de sofrer transdiferenciação em miofibroblastos em um processo conhecido como transdiferenciação ou transição epitelial-mesenquimal (TEM) (LAN, 2003). A TEM é o processo pelo qual o fenótipo adulto sofre regressão para fenótipo embrionário do túbulo metanéfrico/mesenquimal em resposta a uma lesão. O fator de crescimento

transformante beta 1 (TGF- β 1) ativa os fibroblastos em miofibroblastos, desempenhando um papel chave na iniciação e manutenção da TEM (LIU, 2004). As células epiteliais tubulares perdem a sua polaridade apical-basal e tornam-se alongadas, migram para o interstício peritubular através da membrana basal lesada e proliferam de forma exuberante, resultando em fibrose tubulointersticial (QI et al. 2006).

Os fibroblastos corticais renais possuem um importante papel na mediação da comunicação intercelular com células vizinhas/células infiltrantes e MEC, bem como na manutenção da arquitetura do tecido renal. Estas células auxiliam a manutenção e volume de *turnover* da MEC, mas sob condições patológicas, podem participar na resposta fibrótica em uma lesão renal (ZEISBERG et al. 2008). Eles são responsáveis pela produção de fibras do material extracelular e substância fundamental. O bem desenvolvido retículo endoplasmático rugoso, nestas células, reflete uma elevada taxa de síntese de proteínas colagenosas e não colagenosas extracelulares. Estas células também produzem uma variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em condições basal e patológica (QI et al. 2005).

O sistema complemento pode desempenhar um papel na mediação de lesão tubulointersticial através da geração do complexo de ataque à membrana (C5b-9) ou diretamente a nível de túbulos. A deposição de C5b-9 na borda em escova dos túbulos renais pode mediar uma inflamação intersticial, induzindo a ativação de células tubulares e gerando mediadores pró-inflamatórios, incluindo osteopontina (NANGAKU et al. 2002; ROSSINI & FOGO, 2004).

2.4 Aspectos relativos ao *Tissue microarray*

Tissue microarrays (TMA) são blocos contendo numerosos cilindros de tecido parafinado organizados em linhas e colunas que permitem analisar muitas amostras numa única lâmina (ROCHA et al. 2006).

Por mais de um século o material oriundo de biópsias ou necrópsias tem sido preservado em formalina e embebido em parafina, para que se realize o corte por micrótomo e posterior análise. Esse método se tornou padrão para análises histopatológicas (ROCHA et al. 2006).

Kononen e colaboradores (1998) desenvolveram um método para examinar várias amostras de tecidos diferentes de uma só vez, organizando em um mesmo bloco de parafina utilizando pequenos cilindros de tecido. Essas matrizes ou *arrays* de tecidos foram referidas como *tissue microarray* (TMA).

Para a construção dos blocos de TMA é usado um aparelho que utiliza uma agulha para retirar cilindros de tecidos incluídos em blocos de parafina preexistentes (bloco doador) e, posteriormente, são rearranjados em um novo bloco (bloco receptor), podendo desta forma serem rearranjados vários cilindros de tecidos em um único bloco de parafina. As lâminas obtidas desse bloco podem ser analisadas pela técnica rotineira de coloração por hematoxilina e eosina (HE) e/ou por várias outras técnicas, incluindo a imunohistoquímica, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e a hibridização *in situ* cromogênica (CISH) (HOOS & CORDON-CARDO, 2001).

Em uma lâmina obtida do bloco de TMA, é possível conhecer a expressão de um determinado marcador ou uma determinada amplificação ou translocação cromossômica em centenas de amostras ao custo de uma única reação (ANDRADE et al. 2007).

Pode ser destacado dentre as várias aplicações do método, a pesquisa em larga escala de fatores prognósticos ou preditivos das neoplasias, a grande economia de reagentes e de tempo para a realização das reações, bem como a uniformização e a facilidade na interpretação comparativa dos casos, a possibilidade de repetição das reações em múltiplos níveis do bloco e a simplificação do trabalho das linhas de pesquisa pela utilização do bloco em mais de um projeto (MILANES-YEARSLEY et al. 2002; ANDRADE et al. 2007).

TMA é um método eficiente para avaliar a sensibilidade e especificidade dos anticorpos utilizados na determinação da origem ou do tipo de células principalmente em tumores humanos pela imunohistoquímica. O emprego do TMA apresenta grande potencialidade, permitindo boa concordância diagnóstica comparado com a microscopia convencional e imunohistoquímica (HSU et al. 2002; ROCHA et al. 2006).

3. JUSTIFICATIVA

Diante da prevalência e dos poucos estudos realizados direcionados a doença renal crônica sobre a caracterização e identificação de lesões renais por meio da histopatologia em gatos, faz-se necessário um estudo mais aprofundado e uma maior investigação dessas alterações histofuncionais, tendo em vista o maior esclarecimento da fisiopatologia da doença renal crônica em felinos.

Este estudo facilitará a caracterização e mapeamento de lesões tubulares, intersticiais e glomerulares em gatos, contribuindo para correlacionar as alterações de componentes estruturais com a progressão da DRC.

Em pequenos animais, embora alguns relatos sugiram a importância patológica de miofibroblastos renais na progressão da DRC (IDE et al, 2001), ainda se fazem necessários estudos correlacionando a ativação destas células com o DTI e a fibrose intersticial principalmente em gatos, uma vez que o dano tubulointersticial é reconhecido por desempenhar um papel crítico na progressão da DRC nesta espécie e o diagnóstico morfológico mais encontrado em amostras renais felinas é a nefrite tubular crônica (DIBARTOLA, 1987; YABUKI et al. 2010).

Yabuki e colaboradores (2010) demonstraram a indução e proliferação de miofibroblastos na DRC felina com auxílio de α -SMA e vimentina correlacionando estas marcações com o grau de fibrose intersticial e DTI como fator de gravidade na DRC em gatos. Entretanto, segundo os mesmos autores são necessários outros estudos com ênfase na produção de matriz extracelular, fatores de crescimento e mediação de citocinas associados a α -SMA e vimentina na nefropatia felina.

Alguns estudos em humanos, cães e em animais experimentais correlacionam o TGF- β como uma molécula chave no mecanismo de fibrose renal (SHARMA, K. & ZIYADEH, 1994; ROSSINI & FOGO, 2004; IDE et al, 2001). O TGF- β , cuja produção é oriunda de macrófagos ativados, induz a ativação de fibroblastos em miofibroblastos, que são células produtoras de colágenos (LIU, 2004). Entretanto nenhum estudo envolvendo a indução e proliferação de miofibroblastos associados ao TGF- β na fibrose intersticial renal e DTI em gatos foi realizado até o presente momento.

Na microscopia eletrônica, os miofibroblastos são visualizados como grandes células satélites com características morfológicas heterogêneas (KAISLING & LE HIR, 2008), no entanto, a microscopia de luz convencional não pode ser utilizada para distinguir miofibroblastos de fibroblastos quiescentes. Estas limitações consideram a necessidade de

utilizar proteínas marcadoras para a identificação dos miofibroblastos. A α -SMA tem sido usada como bom imunomarcador de miofibroblastos em cães e gatos (IDE et al, 2001; YABUKI et al. 2010).

YABUKI e colaboradores (2010) demonstraram que a α -SMA pode ser usada como marcadores de gravidade da DRC em gatos bem como a vimentina, que também é um marcador de células progenitoras que se transformam em miofibroblastos.

Diante deste contexto, a imunohistoquímica se configura como a ferramenta mais aplicável para a identificação de miofibroblastos e de células participantes no processo de cicatrização e reparo na DRC em gatos.

A potencialidade do *tissue microarray* (TMA) associada à imunohistoquímica no estudo de marcação destas células em cortes de rins de gatos com DRC, valida a sua aplicação, podendo ser utilizado apenas uma pequena alíquota de anticorpo primário, resultando em economia de reagentes e tempo de leitura, além de homogeneizar as reações (ALMEIDA et al. 2008).

Apesar da utilização do TMA estar amplamente validada pela literatura e seu uso ser cada dia mais difundido na análise de tumores na medicina humana, ainda há poucos estudos utilizando este recurso em medicina veterinária. O uso deste recurso ainda não foi reportado no estudo das doenças renais em felinos, incluindo a DRC.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

A partir deste pressuposto, a hipótese central de nossa investigação é que a ativação de miofibroblastos mediada por TGF- β tem papel crucial nos processos fibróticos envolvidos no dano tubulointersticial e fibrose intersticial renal e consequentemente desempenhando papel marcante no desenvolvimento e progressão da doença renal crônica em gatos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Estudar, caracterizar e mapear as lesões renais em gatos e a participação de miofibroblastos na progressão da doença renal crônica mediante histopatologia e imunohistoquímica, com auxílio de *tissue microarray*.

5.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar a marcação de α -SMA , vimentina e TGF- β em secções histológicas de rins de gatos com DRC mediante imunohistoquímica pela técnica de *tissue microarray*;
- ✓ Correlacionar a expressão de α -SMA, vimentina e TGF- β com graus de fibrose intersticial e dano tubulointersticial;
- ✓ Verificar a participação de miofibroblastos mediante expressão de α -AML, vimentina e a participação do TGF- β na fibrose intersticial e dano tubulointersticial;
- ✓ Demonstrar a relação entre o estadiamento da doença renal crônica, graus de fibrose tecidual e o papel de miofibroblastos na progressão da DRC em gatos.

6. CAPÍTULO I

Doença renal crônica em gatos: caracterização morfofuncional de miofibroblastos e imunorreatividade através de *Tissue microarray*

(Chronic kidney disease in cats: morphofunctional characterization of myofibroblasts immunoreactivity through *Tissue Microarray*)

Periódico: Research in Veterinary Science

(Submetido em: 23 de Maio de 2013)

Chronic kidney disease in cats: morphofunctional characterization of myofibroblasts immunoreactivity through *Tissue Microarray*

G. B. Morais^a, J. S. A. M. Evangelista^{a*}, D. A. Viana^b, H. E. O. Beserra^d, M. C. R. Luvizotto^c, C. S. Martins^c, A. M. Sousa^c, G. A. C. Brito^c

^aLaboratory of Histology, College of Veterinary Medicine, State University of Ceará

^bLaboratory of Veterinary Pathology and Legal Medicine, College of Veterinary Medicine, State University of Ceará

^cDepartment of Veterinary Pathology, Araçatuba School of Veterinary Medicine, São Paulo State University

^dLaboratory of Investigative and Comparative Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University

^eLaboratory of Morphology and Image Processing, Federal University of Ceará

* Corresponding author. Graduate Program in Veterinary Sciences, Veterinary Faculty, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará Brazil, Av. Dedé Brasil, 1700 – Campus Itaperi, 60740-903 – Fortaleza, Ceará, Brazil. Tel.: 055(85)31019889; fax: 055 (85)31019850. E-mail address: janainaserrazul@gmail.com (J.S.A.M. Evangelista).

ABSTRACT

The analysis of the cat's kidneys with chronic kidney disease (CKD) aims to verify the immunoreactivity of alpha smooth muscle actin (α -SMA), vimentin and transforming growth factor beta (TGF- β) in CKD through the technics of tissue microarray, correlate these findings with the staging of the disease by serum creatinine (PCre), histopathology and involvement of myofibroblasts in the progression of CKD in cats. The expression of α -SMA, vimentin and TGF- β was evaluated semiquantitatively and correlated with PCre. The correlations PCre with α -SMA, interstitial tubular vimentin and TGF- β glomerular and tubular were significant. There was a significant correlation between all histological parameters (glomerulosclerosis, cellular infiltration and interstitial fibrosis). The correlation between interstitial fibrosis and interstitial expression of α -SMA and TGF- β in the presence of myofibroblasts, directs and leads us to conclude that these cells play an important role in interstitial fibrosis and subsequent progression of the renal disease in cats.

Keywords: Cat. Kidney. CKD. Myofibroblasts

INTRODUCTION

Chronic Kidney disease (CKD) is the second most common cause of death in old cats (SCHENCK & CHEW, 2010), affecting up to 49% of cats over the age of 15 years (DIBARTOLA 2009, POLZIN, 2011;). The main feature of CKD is tubulointerstitial fibrosis, which is one of the best indicators of progression to end-stage renal disease (SINHA et al., 2009). The importance of tubulointerstitial compartment in progressive CKD in cats is supported by the evidence that the severity of tubulointerstitial changes, including tubular atrophy, interstitial infiltration and fibrosis closely resembles a decline in renal function (ROSSINI & FOGO, 2004). Renal interstitial fibrosis is the final step in a sequence of chronic inflammatory processes that follow the kidney tissue injury (IDE et al. 2001).

Renal injury triggers an inflammatory response that recruits pro-fibrotic cytokines such as TGF- β , inducing transformation of renal epithelial and endothelial cells into myofibroblasts in a process termed epithelial-myofibroblast transdifferentiation (EMT). TGF-beta also stimulates the production of extracellular matrix proteins (ECM) and inhibit its degradation. (LIU, 2010; WANG et al. 2011). Myofibroblasts express α -smooth muscle actin (α -SMA) and increase the production of collagen and other ECM components (HOWIE et al. 1995; ZHANG et al. 1995; ASHKENAZI et al. 2006). Vimentin and α -SMA, have been used as markers for the identification of EMT (JIANG et al. 2009), since they start to be expressed only after injury. (KAISLING & LE HIR, 2008; JUNIANTITO et al. 2012).

Kononen et al (1998) developed a method to examine several samples of different tissues at once by arranging in the same paraffin block small cylinders of tissue from different patients. These matrices or arrays of tissues were referred as tissue microarray (TMA). This method has been proved reliable since it has bsimilar results in comparison to conventional microscopy and immunohistochemistry (HSU et al. 2002; ROCHA et al. 2006).

Some reports has suggested the pathological importance of renal myofibroblasts in the progression of CKD in small domestic animals (IDE et al. 2001). Further investigations are necessary to correlate the activation of these cells with tubular interstitial damage (TID) and also the interstitial fibrosis in cats, once the TID is known to play a critical role in the progression of CKD in this species (YABUKI et al. 2010).

The objective of this study was to evaluate the correlation of fibrosis with the expression of alfa-SMA, vimentin and TGF-beta in cats with chronic kidney disease.

MATERIAL AND METHODS

6.1 Experimental Animals

For this study we used 10 cats (*Felis catus*) adults of different breeds and both sexes, aged between 5 and 15 years old, with chronic kidney disease diagnosed by clinical and 1 cat (7 months years old) without any kidney disease. The animals were observed in the clinical and ambulatory Veterinary Hospital Unit of the State University of Ceará and in private clinics of Fortaleza-Ceará, Brazil. All cats died naturally. These animals were diagnosed with chronic kidney disease by clinical examination (abdominal palpation) and laboratory exam (plasmatic creatinine level). No cases of acute renal failure were included in this study. The mean PCr was 7.8 mg/dL (range 1.6 -14mg/dL).

This project was approved by the Ethics Committee for Animal Use of the State University of Ceará (process number: 11585871-7/10), following all the rules of basic care to animals and researchers involved.

6.2 Classification of animals through staging of chronic kidney disease

The animals were classified by the staging of renal disease in 4 stages according to IRIS. The staging is based on algorithms that relate CKD in cats. (IRIS, 2009a). According to this staging system based on the measurement of PCr, 2 cats were belonging to the stage 1 (<1.6mg/dL), 1 cat to stage 2 (1.6-2.8mg/dL), 1 cat to stage 3 (2.9 to 5.0mg/dL) and 6 cats to stage 4 (>5.0mg/dL). The control animal was on stage 1, however, showed no signs of chronic kidney disease.

6.3 Obtaining the Renal sample for light microscopy preparation

Kidneys were harvested, evaluated macroscopically and measured after animals death. Fragments of approximately 1.5cm² from kidneys were taken and immersed in 10% formaldehyde. The sections were processed and embedded in paraffin. Two-µm sections were

placed on glass slides and routinely stained by hematoxylin-eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS), Masson's trichrome, Picrosirius red and periodic acid silver methenamine.

6.5 Prepare of Tissue microarray (TMA)

The construction of the TMA block following the technique modified proposed by Kononen et al. (1998) that uses a fixed base, using a punch of 2mm diameter in a silicon mold (Arraymold Instruments, Utah). Blocks were made with 36 cylinders or cores and the distance between centers of the cylinders was 2mm.

6.5.1 Select of the donor blocks

The donor blocks were the same as used for making slides for light microscopy according to the results presented in histological sections. Histological sections were stained by HE, PAS, Picrosirius red, Masson's trichrome and periodic acid methenamine silver, obtained from donor blocks and then analyzed by estimate the exact representation of the tissue in the donor block.

6.5.2 Building Blocks

The recipient blocks consisted of paraffin blocks with openings of 2mm fragments for receiving donor blocks. Three regions were labeled in each block from the donor tissue taken for three cylinders, and sequentially inserted into the holes of the recipient block. It was also included a cylinder of a liver fragment (the first cylinder placed in line 1/column 1) to guide the start of reading. Therefore, each array contains the cylinders 36, 30 representing the group of animals with CKD in triplicate animal's, 3 with CKD and the first cylinder where is the initiator reading.

6.5.3 TMA slides preparation

Serial sections with 2µm thickness and adhered on silanized slides (Immunoslide, EasyPath®) were obtained from each array and the blades numbered in order of withdrawal in an amount of 6 blades each block. Those that had a larger amount of disk tissue preserved and better organization of rows and columns were selected for immunohistochemical tests. To

determine the representativeness of the TMA in relation to donor blocks, areas were selected in the block corresponding to visual fields containing at least 20% of the kidney fragment by HE staining.

6.6 Preparation of sample for immunohistochemistry

The TMA slides were taken to the oven at 57°C for 3 hours. Subsequently sections were deparaffinized and rehydrated in immersion baths of xylene, followed by baths of absolute ethanol and rinsed in distilled water.

Antigen retrieval was performed by heating the sample in 10mM citrate buffer (pH 6.0) in a water bath for 30 min. Subsequently, the slides were cooled for 20 min, still in the buffer and rinsed in distilled water.

After the antigen retrieval was carried block endogenous peroxidase with peroxide Hydrogen (Dako, USA) for 30 min. Then the sections were washed in 10mM phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 3 min. Incubation was performed for one hour with the primary antibody mouse monoclonal anti- α -SMA (Abcam, UK) diluted a 1:100, mouse monoclonal anti-vimentin (cloneV9, Dako, USA) diluted 1:200.

Then incubation proceeded to wash slides in PBS and incubation with Envision HRP polymer (Dako, USA) for 30 min, with the exception of mouse polyclonal anti-TGF- β 1/2 (Santa Cruz, USA) diluted to 1:50, which received the secondary antibody biotinylated anti-mouse IgG for 30 minutes followed by the avidin-biotin blocking for 30 minutes. The slides were washed in PBS and revealed with DAB liquid (Dab + cromogen substrate + buffer) (Dako, USA) for 1 minute. The sections were counterstained in Meyer's hematoxylin, washed in running water, dehydrated in absolute ethanol, diaphanous in xylene and mounted with cover glass and resin.

6.7 Quantitative Analysis

A quantitative analysis by random semiquantitative scoring system was performed according to previous methods by Raij et al (1984). Picrossirius red stained sections were analyzed by classifying the degree of glomerulosclerosis, interstitial fibrosis and inflammatory infiltrate in twenty fields at 200-fold increase in total Viewed fields and lesions classified by severity

score to the scores 0 to 4 for classification injuries, where 0 = normal, 1 = up to 25% sclerosis, sclerosis 2 = 26-50%, 3 = 51-75% sclerosis, sclerosis and 4 = 76-100% for evaluating the extent of glomerulosclerosis and 0 to 4 where 0 = normal, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe and 4 = very severe interstitial fibrosis and cell infiltration. Analyses were performed by using a Motic ® BA310 trinocular microscope with attached camera (Motic® 2000 2.0 MP Live Resolution) and use the software Motic Image Plus 2.0. The score of glomerulosclerosis, interstitial fibrosis and cellular infiltrate for each animal was assessed by the total 20 fields ranked according to the scores for injury by the following equation:

$$[(1 \times A/20) + (2 \times B/20) + (3 \times C/20) + (4 \times D/20)] \times 100$$

Where A, B, C and D, respectively correspond to the number of glomeruli fibrosis score and inflammatory cell infiltration in 20 fields analyzed and classified by the scores 0, 1, 2, 3 and 4.

For immunohistochemical analysis of immunoreactivity has also been assigned by a scoring system scores from 0 to 4. Each core was evaluated in 10 fields at 400 times magnification and assigned a score based on immunostaining and marking the glomerular, tubular and interstitial intensity level. The scores attributed to the labeling of the α -AML, vimentin and TGF- β were: 0 = negative, 1 = slight marking (up to 10% of marked area), 2 = moderate marking (11 to 50%), 3 = markup strong (50-80%) and 4 = very strong marking (81-100%). It was being assigned a score for each animal using the aforementioned equation with differential number of fields.

6.8 Statistical Analysis

All parameter settings were subjected to statistical analysis by the regression model, with Spearman's correlation coefficient and P values and significance level of 0.05 using the GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., CA. USA).

RESULTS

1. Histopathological findings

Histopathological changes were seen in the three segments of the kidney glomeruli, tubules and interstitium. The glomerular sclerosis was observed in degrees ranging from moderate to severe, and the most prevalent form of severe thickening and crescent formation in parietal leaflet of Bowman's capsule and mesangial proliferation. We observed the presence of capsular fibrosis and hypertrophy of Bowman's capsule (Figure 1).

At the tubular level, was observed with a predominance of moderate to severe TID and observed tubular segments with ballooning degeneration and presenting irregular thickening and segmentation of tubular basement membrane (Figure 2A).

The interstitium showed marked fibrotic material deposition with areas of intense inflammation, which in most cases was lymphoplasmacytic and rich in macrophages. The degree of interstitial fibrosis ranged from moderate to severe in most cases (Figure 2B).

2. Findings of immunoreactivity for Tissue Microarray

Immunostaining for α -SMA was analyzed in the glomerular, tubular and interstitial segments. Regions demarcated in glomerular level were positive for this markup, particularly in glomeruli with sclerosis grade 4. The tubular segment did not show labeling at the level of tubular epithelial cells. The region of the interstitium was heavily marked mainly in areas near fibrotic and rich inflammatory infiltrate, however we did not show this labeling (Figure 3A).

Smooth muscle cells of blood vessels, which are known for positive immunostaining with α -SMA were strongly marked functioning as internal positive control. The marking with vimentin was predominant at tubular and interstitial tubules was showing epithelial cells strongly marked tubular cells alternating with unmarked. The tubular epithelial cells exhibited marked nucleus with well condensed picnotic chromatin (Figure 3B). Mononuclear interstitial infiltrate cells were positively marked for vimentin. Glomerular epithelial cells (podocytes), vimentin-positive marking in healthy kidneys, were positive in that position.

Glomerular and tubular interstitial segments were significant marked by TGF- β and some moderately positive, with slight positivity at the level of inflammatory infiltrate (Figure 3C).

It was not demonstrated markings blades which received only the polymer in the case of α -

SMA and vimentin and anti-mouse IgG in the case of TGF- β 1/2, without incubation with primary antibodies in advance.

3. Quantitative analysis and correlations

Correlations were made among the immunostaining for α -SMA, vimentin and TGF- β 1/2 and PCr, as well as scores of lesions, such as glomerulosclerosis, interstitial fibrosis and inflammatory infiltrate.

The correlation between the expression of α -SMA at interstitium and PCr was significant, as well as between the marking of tubular vimentin and PCr. A significant correlation between marking by TGF- β and PCr, and between glomerular and tubular level were observed (Table 1).

Correlation between interstitial fibrosis and immunostaining for α -SMA was also a significant, and cellular infiltrate and positive staining of TGF- β 1/2 in the interstitial level (Table 1).

For histopathological parameters such as glomerulosclerosis, interstitial fibrosis and cellular infiltration, were all positively and significantly correlated with the PCr (Figure 4).

DISCUSSION

The histopathological findings of this study demonstrated lesions with chronic and progressive character. According to Syme et al. (2006), the morphologic diagnosis more frequent in biopsies of cats with chronic nephropathy is tubulointerstitial nephritis, whose findings are degeneration and tubular injury, interstitial and peritubular fibrosis and interstitial infiltrate with features of chronicity.

A significant correlation between the staging of chronic kidney disease by PCr and histopathological findings suggest that the presence of these lesions may be crucial for a cause of progression of CKD in cats and chronicity of the disease mainly mediated by interstitial tubular damage (DTI) (BOB et al. 2008; YABUKI et al. 2010).

PCre are considered important and reliable as markers of renal injury in veterinary medicine and used in the staging of chronic kidney disease based on IRIS (IRIS 2009a). Although it is known that changes in PCre are only noticeable when only 75% of nephrons are damaged, this measurement is not able to detect lesions and changes to intermediate courses of disease. In stages 1 and 2 of the IRIS staging the disease already has chronic and therefore staging based on this parameter becomes safe and have demonstrated how prognostic factor of CKD in cats (JEPSON et al. 2009).

TID induces a decrease in glomerular filtration rate (GFR) through several mechanisms and consequently decreasing the number of functional nephrons. The tubular atrophy, increases the supply of fluid to the macula densa and triggers a reduction in GFR through tubuloglomerular feedback (BOHLE et al. 1997). Furthermore, DTI results in the obliteration of the glomerular capillary post, leading to ischemic renal injury and further progressive injury. Thus, it is widely recognized that tubulointerstitial injury serves as an important mediator and a final common pathway of chronic renal failure (NANGAKU, 2002). DTI can be seen in the results of this work and may be implicated in the severity of injuries and perpetuation and consequently the tubular fibrotic processes, since interstitial fibrosis is a classic finding for this process and that the injury factor ends on persistent lesions that generate repair.

The use of Tissue microarray immunohistochemistry as a tool for study the injuries provided a homogeneous marking and representative when compared to conventional blades immunohistochemistry. This technique has many potential applications and are an efficient method to evaluate the sensitivity, specificity and marking of antibodies used in determining the origin or type of cells by immunohistochemistry (ANDRADE et al. 2007).

The positive immunostaining for α -SMA level in some interstitial cells immersed in fibrotic interstitial matrix suggests the presence of myofibroblasts in sites where there is plenty of interstitial fibrotic material. Myofibroblasts can be differentiated from fibroblasts when express cytoplasmic protein α -SMA (JUNIANITO et al. 2012). The conventional light microscopy did not differ immunostaining with an important tool for the differentiation of these cells and visualization in cats (IDE et al. 2001). Yabuki et al. (2010) also used immunostaining with α -SMA to demonstrate the involvement of myofibroblasts in the progression of CKD in cats.

Myofibroblasts are cells involved in the overproduction of ECM and stiffness and contraction of this matrix due to the expression of α -SMA and consequent incorporation into this protein fibers voltage pre-existing stiffening the anchoring of collagen with subsequent formation of interstitial fibrosis (HINZ, 2006; WIPFF & HINZ, 2009).

In a previous study it was shown that the expression of α -SMA interstitial with PCre are significantly correlated with the severity of histopathologic lesions in cats (SAWASHIMA et al. 2000). A significant correlation between the immunostaining α -SMA with Creat and interstitial fibrosis in our study, suggests an important role of myofibroblasts in interstitial fibrosis and subsequent progression of kidney disease in cats.

Our results demonstrated the presence of tubular epithelial cells strongly stained intercalated unmarked cells of vimentin in a single tubule. Dialing vimentin has been demonstrated in various kidney diseases in humans, however there is no detection at the level of tubular epithelium in normal kidneys (RASTALDI et al. 2002).

Marking vimentin has been strongly correlated with the progression of fibrosis in human kidney transplanted (HERTIG et al. 2008). The results demonstrated a significant correlation between the level of vimentin marking and degrees of tubular interstitial fibrosis that was found. A similar result was also described in cats by Yabuki et al. (2010).

Vimentin is a structural protein found in cells with a mesenchymal phenotype, therefore the marking of tubular epithelial cells in a change of the phenotype suggests a possible epithelial and mesenchymal transition (MET). Epithelial cells change their phenotype to mesenchymal undergo the process called MET (MORISHITA & KUSANO, 2011).

When 10% of the tubular cells loose their epithelial proteins and possess characteristics of MET may have changes in serum creatinine level and the degree of interstitial damage (RASTALDI et al. 2002). The possibility of the presence of MET coupled with marked interstitial fibrosis leads us to recognize this transition as an important feature of escape from cell death caused by severe TID and important for the significant interstitial fibrosis, consequently to the progression of kidney disease in cats.

TGF- β is a key cytokine in both activations of fibroblasts to myofibroblasts as in EMT

(ZAVADIL & BOTTINGER, 2005). Three isoforms of TGF- β (TGF- β 1, 2 and 3) were identified in mammals and all isoforms are involved in EMT (SHIRAKIHARA et al. 2011). TGF- β 1 isoform is the most extensively studied in the renal tubular cell MET (EDDY, 2000). However, no study correlates this growth factor in the progression of kidney disease in cats.

This growth factor is capable of activating genes that encode proteins and promote changes in renal tubular cells during the process of EMT (MORISHITA & KUSANO, 2011). TGF- β has been used as a marker for myofibroblasts in fibrotic processes involving various diseases, especially in kidney (PETROV et al. 2008; WU et al. 2013). Our study demonstrated the marking by immunohistochemistry for TGF- β 1/2, this cytokine at tubular and glomerular significantly correlated to PCre level and interstitial fibrosis and cellular infiltrate.

In our work, the marking of cells in the interstitium by TGF- β 1/2, together with the marking by α -SMA suggests the presence of myofibroblasts and it is the macrophages that secrete this growth factor. The presence of TGF- β thus contributes to the activation of fibroblasts to myofibroblasts and subsequent interstitial fibrosis culminating in the progression of kidney disease in cats.

We conclude that the results obtained in this study showed a significant correlation between immunostaining for α -SMA, vimentin and TGF- β with PCre and histopathological findings for staging and progression of CKD in cats. Immunostaining for α -SMA and TGF- β in cells present in the interstitial fibrotic and inflammatory infiltrate suggests participation of myofibroblasts and subsequent implication in the progression of chronic kidney disease in cats.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank CNPq, CAPES, FUNCAP and FINEP, for the financial support in the form of grants and fellowship awards.

CONFLICT OF INTEREST

The authors of this article declare that there are no potential conflicts of interest including employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony and patent

applications/registrations related to the current manuscript.

REFERENCES

Andrade, V.P., Cunha, I.W., Da Silva, E.M., Ayala, F., Sato, Y., Ferreira, S.S., Nascimento, C.F., Soares, F.A., 2007. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 43, 55-60.

Askenazi, D.J., Feig, D.I., Graham, N. M., Hui-Stickle, S., Goldstein, S.L., 2006. 3-5 year longitudinal follow-up of pediatric patients after acute renal failure. *Kidney International*, v. 69, n.1, p. 184-189.

Bob, F.R., Gluhovschia, G., Hermanb, D., Potenczb, E., Gluhovschia, C., Trandafirescu, V., Schillera, A., Petricaa, L., Velciova, S., Bozdoga, G. Vernic, C., 2008. Histological, immunohistochemical and biological data in assessing interstitial fibrosis in patients with chronic glomerulonephritis. *Acta histochemica* 110, 196—203.

Bohle, A., Backensen-Haen, S., von Gise, H., 1987. Significance of tubulo- interstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney. *American Journal of Nephrology* 7, 421—433.

Dibartola, S.P., 2009. Fluid, electrolyte, and acid base abnormalities in cats with chronic renal disease. *In: 2009 Proceedings of the International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians*. May 29-31, 2009, Rimini, Italy, 144-145. Acess May, 25th, 2013. http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2009/DiBartola2_en.pdf

Eddy, A.A., 2000. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatric and Nephrology* 15, 290-301.

Hertig, A., Anglicheau, D., Verine, J., Pallet, N., Touzot, M., Ancel, P.Y., Mesnard, L., Brousse, N., Baugey, E., Glotz, D., Legendre, C., Rondeau, E., Xu-Dubois, Y.C., 2008. Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 19, 1584-1591.

Hinz, B., 2006. Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *European Journal of Cell Biology* 85,175–181.

Howie, A. J.; Rowlands, D.C.; Reynolds, G.M.; Barnes, A.D., 1995. Measurement of proliferation in renal biopsy specimens: Evidence of subclinical tubular damage in the nephrotic syndrome. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, v.10, p.2212-2218.

Hsu, F.D.; O’Nielsen, T.; Alkushi, A.; Dupuis, B.; Huntsman, D.; Liu, C.L.; Rijn, M.V.; Gilks, C.B., 2002. Tissue Microarrays Are an Effective Quality Assurance Tool for Diagnostic Immunohistochemistry. *Modern Pathology*, v.15, n.12, p.1374–1380.

Ide, M., Yamate, J., Kuwamura, M., Kotani, T., Sakuma, S., Takeya, M., 2001. Immunohistochemical analysis of macrophages and myofibroblasts appearing in hepatic and renal fibrosis of dogs. *Journal of Comparative Pathology* 124, 60–69.

IRIS. (2009a). *Staging of CKD*. Acess May, 23th, 2013, de IRIS (International Renal Interest Society), http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS2009_Staging_CKD.pdf

Jepson, R.E., Brodbelt, D., Vallance, C., Syme, H.M., Elliott, J., 2009. Evaluation of predictors of the development of azotemia in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 806–813.

Juniantito, V., Izawa, T., Yuasa, T., Ichikawa, C., Tanaka, M., Kuwamura, M., Yamate, J., 2012. Immunophenotypical analysis of myofibroblasts and mesenchymal cells in the bleomycin-induced rat scleroderma, with particular reference to their origin. *Experimental and Toxicologic Pathology*.

Kaissling, B. & Le Hir, M., 2008. The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochemistry and Cell Biology*, v.130, p.247–262.

Kononen, J., Bubendorf, L., Kallionimeni, A., Bärklund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M. J., Sauter, G., Kallionimeni, O., 1998. Tissue microarrays for high-

throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine* 4, 844-847.

Morishita, Y., Kusano, E., 2011. Cellular and Molecular Basis of Epithelial-Mesenchymal Transition in Renal Fibrosis. *Journal of Nephrology and Therapeutics* 1-4.

Jiang, T., Zhou, Q., Huang, B., 2009. Role of angiotensin II and JAK2 signal pathway in transdifferentiation of renal tubular cells in mice after acute ischemic followed by reperfusion. *Chinese Journal of Pathology*, v. 38, n.7, p.466-471.

Liu, Y., 2010. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 21, n.2, p. 212-222.

Nangaku, M. Final common pathways of progression of renal diseases 2002. *Clinical and Experimental Nephrology* 6,182–189.

Petrov, V. V, Peltb, J.F., Vermeesch, J.R., Duppend, V. J. V., Vekemansb, K., Fagarda, R. H., Lijnen, P.J., 2008. TGF- β 1-induced cardiac myofibroblasts are nonproliferating functional cells carrying DNA damages. *Experimental cell research* 314, 1480 – 1494.

Polzin, D.J., 2011. Chronic Kidney Disease in Small Animals. *Veterinary Clinics of Small Animal* 41, 15–30.

Raij, L, Azar, S., Keane, W., 1984. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney international*, 26, 137—143.

Rastaldi, M.P., Ferrario, F., Giardino, L., Dell'Antonio, G., Grillo, C., Grillo, P., Struz, F., Müller, G.A., Colasanti, G., D'Amico, G., 2002. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney International* 62, 137-146.

Rocha, R.M.; Andrade, V.P.; Nunes, C.B.; Rocha, G.F.S.; Sanches, F.S.F.; Oliveira, F.N.; Gobbi, H., 2006. Construção de *arrays* de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imuno-histoquímico de tumores mamários. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.42, n.6, p. 477-482.

Rossini, M., Fogo, A.B., 2004. Mechanisms leading to progression of chronic renal injury: the interstitium. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms- Genitourinary diseases* 1, 65-71.

Sawashima, K., Mizuno, S., Mizuno-Horikawa, Y., Shimada, A., Kudo, T., Kurosawa, T., 2000. Expression of alpha-smooth muscle actin and fibronectin in tubulointerstitial lesions of cats with chronic renal failure. *American Journal of Veterinary Research* 61, 1080–1086.

Shenck, P.A., Chew, D.J., 2010. Diet and chronic renal disease. In: Schenck, P. (Ed), *Homeprepared dog & cat diets*. Iowa: Wiley-Blackwell, 556 pp.

Shirakihara, T., Horiguchi, K., Miyazawa, K., Ehata, S., Shibata, T., Morita, I., Miyazono, K., Saitho, M., 2011. TGF beta regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *The EMBO Journal* 30, 783-795.

Sinha, R., Nandi, M., Tullus, K., Marks, S.D., Taraphder, A., 2009. Ten-year follow-up of children after acute renal failure from a developing country. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 24, n.3, p. 829-833.

Syme, H. M., Markwell, P. J., Pfeiffer, D., Elliott, J., 2006. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 528-535.

Wang, H., Wang, Y., Cui, M., Gu, C., Yang, L., Zhao, Y., Chen, Y., Zhao, D., Li, T., Chi, B., 2011. Hepatocyte growth factor-induced amelioration in renal interstitial fibrosis is associated with reduced expression of alpha-smooth muscle actin and transforming growth factor-beta1. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, v. 48, n.5, p. 308-315.

Wipff, P., Hinz, B., 2009. Myofibroblasts work best under stress. *Journal of Body work and Movement Therapies*, 13, 121–127.

Wu, C., Chiang, W., Lai, C., Chang, F., Chen, Y., Chou, Y., Wu, T., Linn, G., Ling, H. Wu, K., Tsai, T., Chen, Y., Duffield, J.S., Lin, S., 2013. Transforming Growth Factor b-1 Stimulates Profibrotic Epithelial Signaling to Activate Pericyte-Myofibroblast Transition in Obstructive Kidney Fibrosis. *The American Journal of Pathology* 182, 1, 118-131.

Yabuki, A., Mitani, S., Fujiki, M., Misumi k., Endo, Y., Miyoshi, N., Yamato, O., 2010. Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: Induction of myofibroblasts. *Research in Veterinary Science* 88, 294–299.

Zhang, G., Moorhead, P.J., El Nahas, A.M., 1995. Myofibroblasts and progression of experimental glomerulonephritis. *Experimental Nephrology* 3, 308-318.

Zavadil, J., Bottinger, E.P., 2005. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24: 5764-5774.

ANNEX

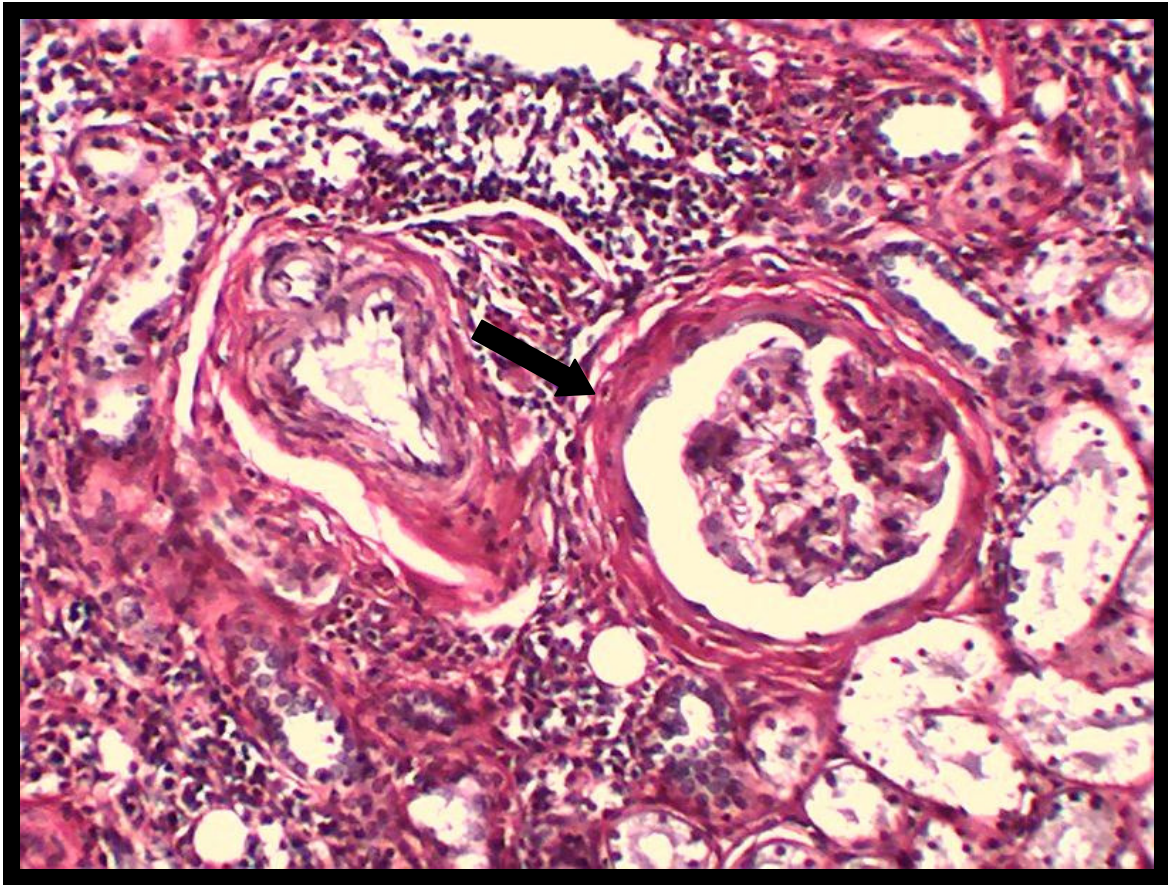


Fig 1. Photomicrograph of cat kidney with chronic kidney disease stage 3. The glomerulus shows thickening of the parietal sheet of Bowman's capsule with marked sclerosis and capsular fibrosis and mononuclear interstitial infiltration. Picrosirius red, 400x increase.

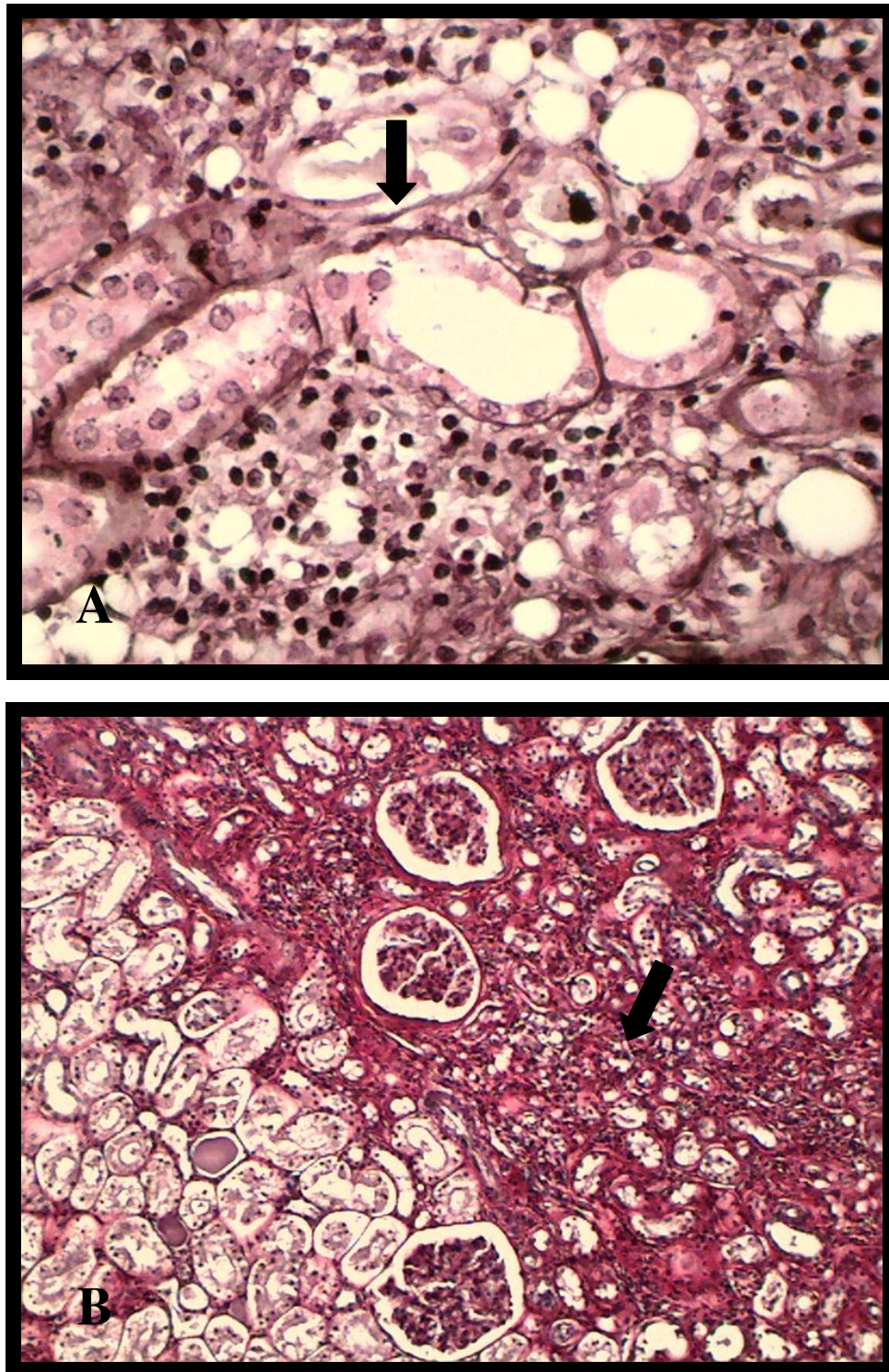


Figure 2. Photomicrographs of cat kidney with chronic kidney disease stage 3. (A): Segments of tubules with degeneration presenting irregular thickening and segmentation of tubular basement membrane (Black arrow). Stained with Methenamine silver periodic acid, 400x. (B): Interstitial inflammatory infiltrate with severe and exuberant interstitial fibrosis. Stained with Picrosirius red, 100x (Black arrow).

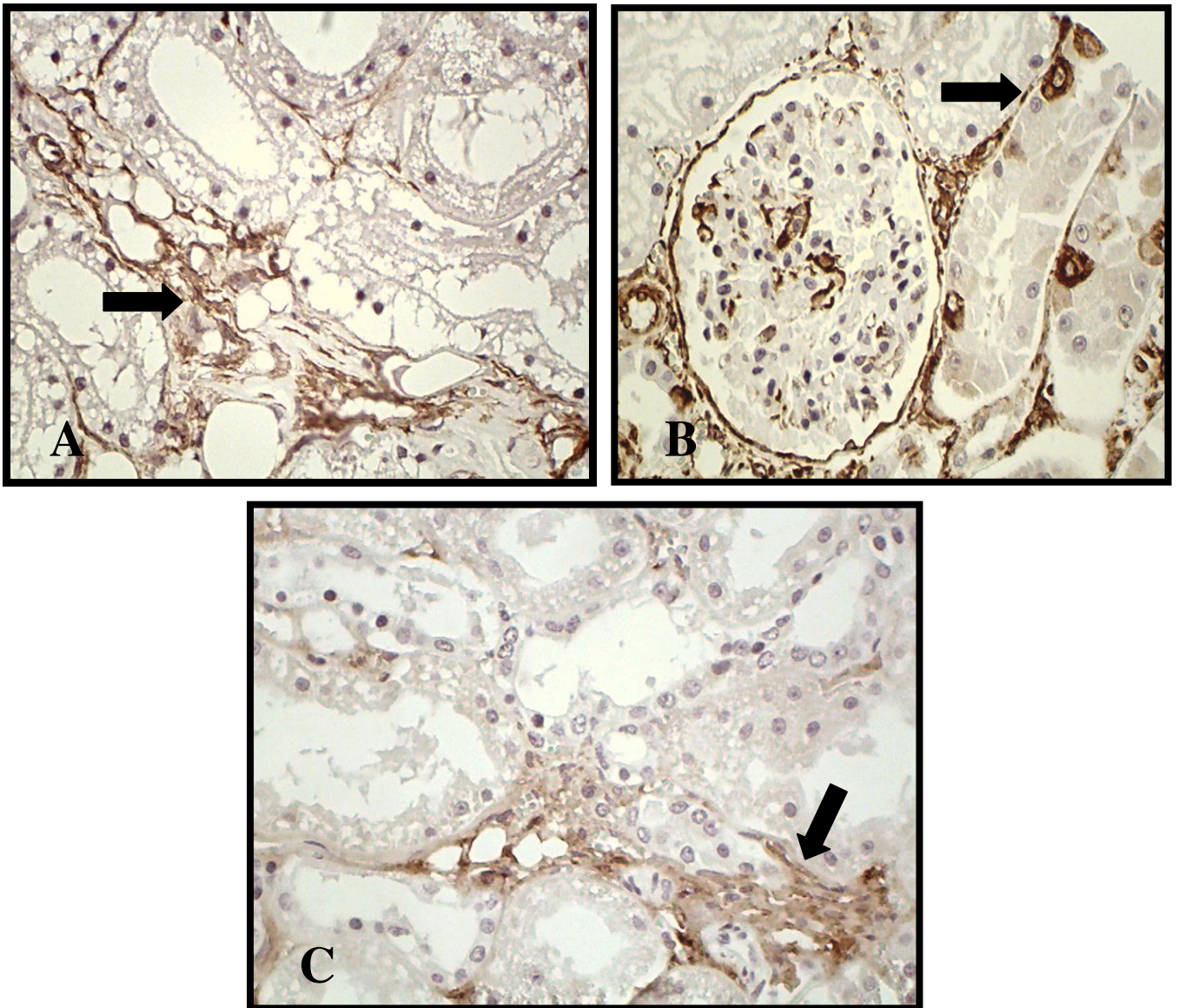


Figure 3. Immunohistochemistry for detection of α -SMA, vimentin and TGF- β 1/2 in cat kidney with chronic kidney disease. (A): α -SMA. The region of the interstitium was heavily marked mainly in areas near fibrotic and inflammatory infiltrate rich. 400x. (B): Vimentin. The marking vimentin at tubular and interstitial tubules showing epithelial cells strongly marked and alternating tubular cells unmarked. 400x. (C): TGF- β 1/2. Interstitial segments moderately positive and discrete positive immunostaining at the level of inflammatory infiltrate. 400x.

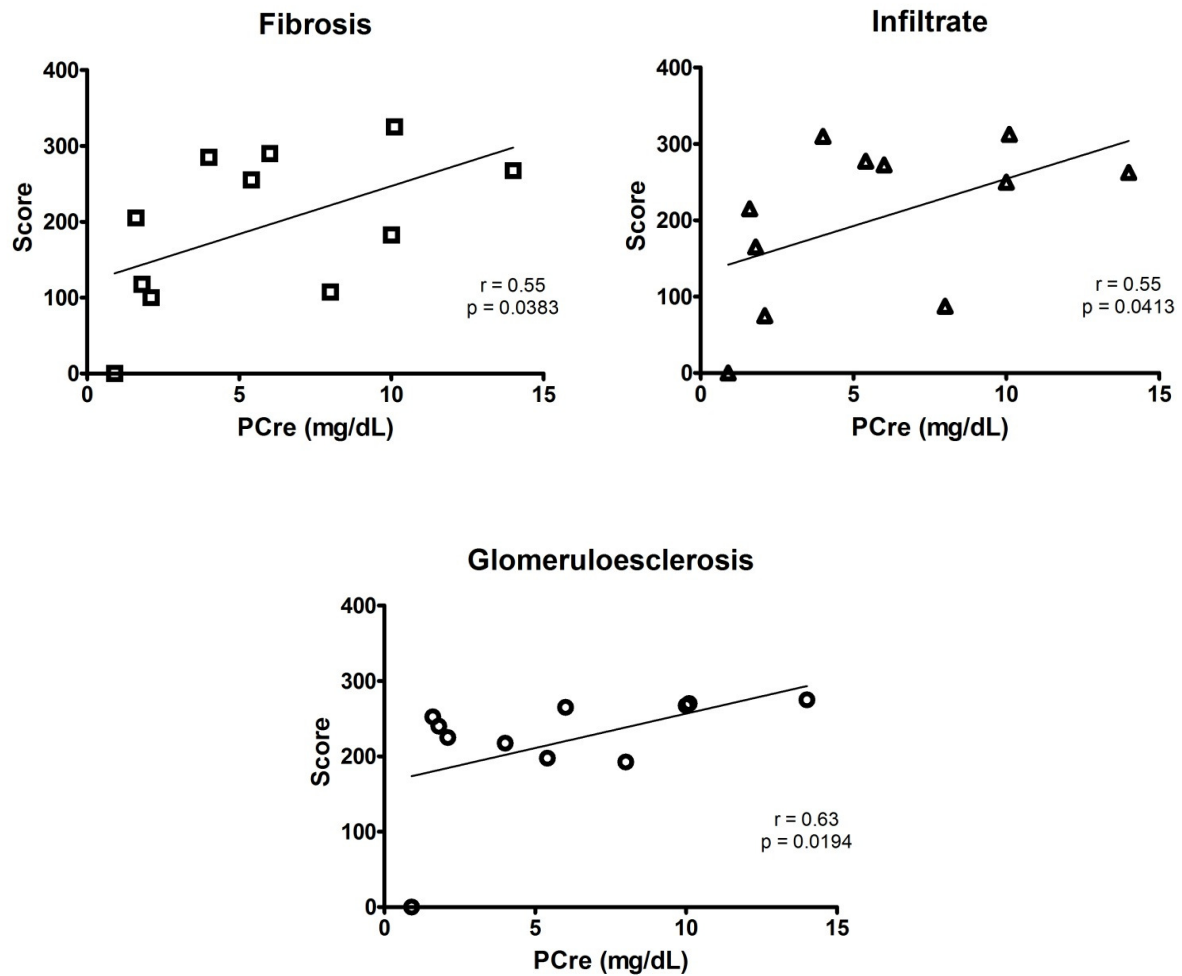


Figure 4. Correlations between histopathological parameters of interstitial fibrosis, cellular infiltration and glomerulosclerosis with plasmatic creatinine (Pcr). $P < 0.05$.

Table 1. Correlations between immunostaining for alpha smooth muscle (α -SML), vimentin and beta transformant growth factor (TGF- β 1/2) with creatinine level (Pcre) and histopathological parameters.

	α -SMA			Vimentin			TGF- β 1/2		
	G	T	I	G	T	I	G	T	I
Pcre	NS	NS	0.55*	NS	0.73*	NS	0.66*	0.59*	NS
Glomeruloesclerosis	0,66*	NS	NS	NS	NS	NS	0.53*	NS	NS
Interstitial fibrosis	0.72*	NS	0.53*	NS	0.71*	NS	0.83*	NS	NS
Cellular infiltrate	0.63*	NS	NS	0.53*	0.66*	0.54*	0.75*	0.55*	0.57*

G: Glomerular, T: Tubular, I: Interstitial

NS: Not significant

* $P < 0,05$

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que as alterações histopatológicas podem ser correlacionadas positivamente com a imunomarcação através do *Tissue microarray* por alfa actina de músculo liso (α -SMA), vimentina e fator de crescimento transformante beta (TGF- β) na doença renal crônica em gatos.

Os resultados da imunohistoquímica associados as alterações nos valores de creatinina plasmática e achados histopatológicos nos fornecem subsídios para correlacionar a participação de miofibroblastos na doença renal crônica felina e também na progressão desta doença.

Os graus de fibrose intersticial e lesões tubulares associadas à marcação de células intersticiais por α -AML nos sugerem a presença dos miofibroblastos na lesão intersticial fibrótica e consequente alteração da função renal e progressão da DRC em gatos.

Os miofibroblastos desempenham um papel importante na doença renal crônica felina, necessitando de estudos complementares com proliferação e determinação da atividade destas células.

8. PERSPECTIVAS

Os gatos são afetados pela DRC com um percentual elevado e há poucos recursos disponíveis para prevenção da evolução da doença até o momento. Diante disto, torna-se importante a busca de mecanismos que desencadeiam a progressão desta enfermidade e esclareça vias de perpetuação desta progressão. Assim, os estudos das células envolvidas na geração de fibrose e dano tubular são sumamente importantes e necessários para que haja maior compreensão da evolução e progressão da DRC de uma maneira mais completa nos gatos, tanto a nível estrutural, celular e molecular.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPERS, C. E.; HUDKINS, K. L.; GOWN, A. M.; JOHNSON, R. J. Enhanced expression of “muscle-specific” actin in glomerulonephritis. *Kidney International*, v.41, p.1134–1142, 1992.

AMADOR, S. M. S. *Doença renal crónica idiopática felina*. 2009.123 p., Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa- Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2009.

ANDRADE, V. P.; CUNHA, I. W.; DA SILVA, E. M.; AYALA, F.; SATO, Y.; FERREIRA, S. S.; NASCIMENTO, C. F.; SOARES, F. A. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.43, n.1, p.55-60, 2007.

BARBER, P. J. The kidney. In: CHANDLER, E. A.; GASKELL, C. J. & GASKELL, R. M. (Eds), *Feline medicine and therapeutics*, 904 p., Oxford: Blackwell Publishing, 2004, p.281-303.

BASCANDS, J. L. & SCHANSTRA, J. P. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney International*, v.68, p.925–937, 2005.

BECKER, G. J.; PERKOVIC, V.; HEWITSON, T. D. Pharmacological intervention in renal fibrosis and vascular sclerosis. *Journal of Nephrology*, v.14, p.332–339, 2001.

BOYD, L. M.; LANGSTON, C.; THOMPSON, K.; ZIVIN, K. & IMANISHI, M. Survival in Cats with Naturally Occurring Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.22, n.5, p.1111-1117, 2008.

BROWN, E. M. Urinary System. In: DELLMANN, H.D. & BROWN, E. M. (Eds) *Textbook of veterinary histology*, 468 p., Philadelphia: Lea & Febiger, 1987, p.264 -285.

BROWN, S. A. Evaluation of Chronic Renal Disease: A Staged Approach. *Compendium On Continuing Education For The Practicing Veterinarian*, v.21, n.8, p.752-763, 1999.

CAMARGO, M. H. B. *Alterações morfológicas e funcionais dos rins de cães com insuficiência renal crônica*. 2002. 45 p., Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2002.

CLARKSON, C. E.; FLETCHER, T. F. Anatomy of the kidney and proximal ureter. In: POLZIN, D. J.; BARTES, J. (Eds), *Nephrology and Urology of Small Animals*, 920p., Oxford: Blackwell Publishing, 2011, p.21-27.

CONFER, A.W.; PANCIERA, R. J. Sistema urinário. In: CARLTON, W.W.; McGAVIN, M. D. (Eds), *Patologia veterinária especial de Thomson*, 672 p., São Paulo: Artmed, 1998, p.228-265.

DIBARTOLA, S. P. Fluid, electrolyte, and acid base abnormalities in cats with chronic renal disease. In: *2009 Proceedings of the International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians*. May 29-31, 2009, Rimini, Italy, 144-145. Acesso em 23 de Maio de 2013, Disponível em: http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2009/DiBartola2_en.pdf

DIBARTOLA, S. P.; RUTGERS, H. C.; ZACK, P. M. & TARR, M. J. Clinicopathologic findings associated with chronic renal disease in cats: 74 cases (1973-1984). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.190, n.9, p.1196-1202, 1987.

EDDY A. A. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.7, p.2495-2508, 1996.

EDDY, A. A. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatric Nephrology*, v.15, p.290–301, 2000.

EDDY, A. A. Role of cellular infiltrates in response to proteinuria, *American Journal of Kidney Disease*, v.37, s.2, p.S25–S29, 2001.

ELLIOTT, J. & BROWN, S. *Pocket guide to renal disease in the dog and cat*, 121 p., Oxfordshire: Nova Professional Media Limited, 2004.

ELLIOTT, J. & WATSON, A. D. Chronic Kidney Disease: Staging and Management. In: J. D. BONAGURA, & D. C. TWEDT (Eds), *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*, 1440 p., St. Louis: Saunders Elsevier, 2009, p.883-891.

FREITAS, C. F. H. *Estadiamento da doença renal crónica em felinos*. 2010. 125 p., Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa- Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2010.

GABBIANI, G. The biology of the myofibroblast. *Kidney International*, v.41, p.530– 532, 1992.

GELEILETE, T. J. M.; COSTA, R. S.; DANTAS, M.; COIMBRA, T. M. α -Smooth muscle actin and proliferating cell nuclear antigen expression in focal segmental glomerulosclerosis: functional and structural parameters of renal disease progression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.34, n.8, p.985-991, 2001.

GOUMENOS, D. S.; TSAMANDAS, A. C.; OLDROYD, S.; SOTSIOU, F.; TSAKAS, S.; PETROPOULOU, C.; BONIKOS, D.; EL NAHAS, A. M.; VLACHOJANNIS, J. G. Transforming growth factor-beta (1) and myofibroblasts: a potential pathway towards renal scarring in human glomerular disease. *Nephron*, v.87, p.240-248, 2001.

GRAUER, G. F. Alleviating clinical signs and slowing progression of chronic renal failure. In: *North American Veterinary Conference*, 1994, Orlando. Proceedings... Orlando, 1994a.

GRAUER, G.F. Acute renal failure and chronic kidney disease. In: NELSON, R.W. & COUTO, C.G. (Eds.), *Small Animal Internal Medicine*, 1504 p., Mosby: Missouri, 2009, p.645-659.

GRIMM, P. C.; NICKERSON, P.; JEFFERY, J.; SAVANI, R. C.; GOUGH, J.; MCKENNA, R. M.; STERN, E.; RUSH, D. N. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *The New England Journal of Medicine*, v.345, p.93-97, 2001.

GUYTON, A. C & HALL, J. E. Formação da urina pelos rins: I. Fluxo sanguíneo renal, filtração glomerular e seu controle. In: GUYTON, A. C. & HALL, J. E (Eds), *Tratado de fisiologia médica*, 1216 p., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, p.307-325.

HEWITSON, T. D. & BECKER, G. J. Interstitial myofibroblasts in IgA glomerulonephritis. *American Journal of Nephrology*, v.15, p.111-117, 1995.

HEWITSON, T. D. Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, v.296, p.F1239-F1244, 2009.

HOOS, A. & CORDON -CARDO, C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Laboratory Investigation*, v.81, p.1331-8, 2001.

HOWIE, A. J.; ROWLANDS, D. C.; REYNOLDS, G. M.; BARNES, A. D. Measurement of proliferation in renal biopsy specimens: Evidence of subclinical tubular damage in the nephrotic syndrome. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, v.10, p.2212-2218, 1995.

HSU, F. D.; O NIELSEN, T.; ALKUSHI, A.; DUPUIS, B.; HUNTSMAN, D.; LIU, C. L.;

RIJN, M. V.; GILKS, C. B. Tissue Microarrays Are an Effective Quality Assurance Tool for Diagnostic Immunohistochemistry. *Modern Pathology*, v.15, n.12, p.1374–1380, 2002.

IDE, M.; YAMATE, J.; KUWAMURA, M.; KOTANI, T.; SAKUMA, S.; TAKEYA, M. Immunohistochemical analysis of macrophages and myofibroblasts appearing in hepatic and renal fibrosis of dogs. *Journal of Comparative Pathology*, v.124, p.60–69, 2001.

IRIS. (2009a). *Staging of CKD*. Acesso em 23 de maio de 2013, IRIS (International Renal Interest Society, disponível em: http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS2009_Staging_CKD.pdf

JUNIANITO, V.; IZAWA, T.; YUASA, T.; ICHIKAWA, C.; TANAKA, M.; KUWAMURA, M.; YAMATE, J. Immunophenotypical analysis of myofibroblasts and mesenchymal cells in the bleomycin-induced rat scleroderma, with particular reference to their origin. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2012.

KAISLING, B. & LE HIR, M. The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochemistry and Cell Biology*, v.130, p.247–262, 2008.

KELLY, C. J. & NEILSON, E. G. Tubulointerstitial diseases. In: BRENNER, B. M. (Ed.), *The Kidney*, 2448 p., W.B. Saunders: Philadelphia, 2007, p.1174–1197.

KLIEM, V.; JOHNSON, R. J.; ALPERS, C. E.; YOSHIMURA, A.; COUSER, W. G.; KOCH, K. M.; FLOEGE, J. Mechanisms involved in the pathogenesis of and interstitial fibrosis tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney International*, v.49, p.666–678, 1996.

KOEMAN, J. P.; BIEWENGA, W. J.; GRUYS, E. Proteinuria associated with glomerulosclerosis and glomerular collagen formation in three Newfoundland dog littermates. *Veterinary Pathology*, v.31, n.2, p.188-193, 1994.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIMENI, A.; BÄRLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIMENI, O. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*, v.4, n.7, p.844-7, 1998.

LAN, H. Y.; MU, W.; TOMITA, N.; HUANG, X. R.; . LI, J. H.; ZHU, H.; MORISHITA, R.; JOHNSON, R. J. Inhibition of Renal Fibrosis by Gene Transfer of Inducible Smad7 Using Ultrasound-Microbubble System in Rat UUO Model. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.14, p.1535–1548, 2003.

LIU, Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.15, p.1–12, 2004.

MILANES-YEARSLEY, M.; HAMMOND, E. H.; PAJAK, T. F.; COOPER, J. S.; CHANG, C.; GRIFFIN, T.; DIANA NELSON, D.; LARAMORE, G.; PILEPICH, M. Tissue microarray: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Modern Pathology*, v.15, n.12, p.1366-1373, 2002.

MINKUS, G. & HORAUF, A. Evaluation of renal biopsies in cats and dogs – histopathology in comparison with clinical data. *Journal of Small Animal Practice*, v.35, p.465-472, 1994.

MUCHANETA-KUBARA, E. C. & EL NAHAS, A. M. Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, v.12, p.904-915, 1997.

MUNGER, J. S.; HUANG, X.; KAWAKATSU, H.; GRIFFITHS, M. J. D.; DALTON, S. L.; WU, J.; PITTET, J. F.; KAMINSKI, N.; GARAT, C.; MATTHAY, M. A.; RIFKIN, D. B.; SHEPPARD, D. The integrin α v β 6 binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis, *Cell*, v.96, p. 319–328, 1999.

NANGAKU, M. Final common pathways of progression of renal diseases. *Clinical and Experimental Nephrology*, v.6, p.182–189, 2002.

NANGAKU, M.; PIPPIN, J.; COUSER, W. C6 mediates chronic progression of tubulointerstitial damage in rats with remnant kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.13, p.928–936, 2002.

NANGAKU, M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Internal Medicine*, v.43, p.9–17, 2004.

NG, Y. Y.; HUANG, T. P.; YANG, W. C.; CHEN, Z. P.; YANG, A. H.; MU, W.; NIKOLIC PATERSON, D. J.; ATKINS, R. C.; LAN, H. Y. Tubular epithelial myofibroblasts transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney International*, v.54, p.864–876, 1998.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A. & ROSS, S. Insuficiência Renal Crônica. In: ETTINGER, S. J. & FELDMAN, E. C. (Eds), *Tratado de Medicina Interna Veterinária*, 2156 p., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, v.2, p.1721-1751.

POLZIN, D. J. Chronic Kidney Disease in Small Animals. *Veterinary Clinical of Small Animal*, v. 41, p.15–30, 2011.

QI, W.; CHENA, X.; PORONNIK, P. B.; POLLOCK, C. A. The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.38, p.1–5, 2006.

REECE, W. O. Função renal nos mamíferos. In: REECE, W. O. (Ed), *Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos*, 926 p., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.67- 96.

ROCHA, R. M.; ANDRADE, V. P.; NUNES, C. B.; ROCHA, G. F. S.; SANCHES, F. S. F.; OLIVEIRA, F. N.; GOBBI, H. Construção de *arrays* de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imuno-histoquímico de tumores mamários. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.42, n.6, p. 477-482, 2006.

ROSS, S. J.; POLZIN, D. J. & OSBORNE, C. A. Clinical progression of early chronic renal failure and implications management. In: AUGUST, J. R. (Ed), *Consultations in Feline Internal Medicine*, 920 p., Missouri: Elsevier, 2006, p.389-397.

ROSSINI, M. & FOGO, A. B. Mechanisms leading to progression of chronic renal injury: the interstitium. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms- Genitourinary diseases*, v.1, n.1, p.65-71, 2004.

ROUDEBUSH, P.; POLZIN, D. J.; ROSS, S. J.; TOWELL, T. L.; ADAMS, L. G.; FORRESTER S. D. Therapies for feline chronic kidney disease. What is the evidence? *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.11, n.3, p.195-210, 2009.

SAM, R.; WANNA, L.; GUDEHITHLU, K. P.; GARBER, S. L.; DUNEA, G.; ARRUDA, J. A. L.; SINGH, A. K. Glomerular epithelial cells transform to myofibroblasts: early but not late removal of TGF- α reverses transformation. *Translational Research*, v.148, n.3, p.142-147, 2006.

SENIOR, D. F. In: DUNN, J. K. (Ed), *Tratado de medicina de pequenos animais*, 1076 p., São Paulo: Roca, 2001, p.614-620.

SHARMA, K. & ZIYADEH, F. N. The emerging role of transforming growth factor- β in kidney disease, *American Journal of Physiology*, v.266, p.F829– F842, 1994.

SHENCK, P. A. & CHEW, D. J. Diet and chronic renal disease. In: SCHENCK, P. (Eds), *Homeprepared dog & cat diets*, 556 p., Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, p.181-194.

STEVANATO, S. P. *Insuficiência renal crônica em gatos*. 2008. 14p. Trabalho de Conclusão de Especialização em Clínica Médica de Pequenos Animais - Instituto Qualittas de Ensino, Agudos, 2008.

SYME, H. M.; MARKWELL, P. J.; PFEIFFER, D. & ELLIOTT, J. Survival of Cats with Naturally Occurring Chronic Renal Failure is Related to Severity of Proteinuria. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.20, n.3, p.528-535, 2006.

WIGGINS, R.; GOYAL, M.; MERRITT, S.; KILLEN, P. D. Vascular adventitial cell expression of collagen I messenger ribonucleic acid in anti-glomerular basement membrane antibody induced crescentic nephritis in the rabbit. A cellular source for interstitial collagen synthesis in inflammatory renal disease. *Laboratory Investigation*, v.68, p.557-565, 1993.

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

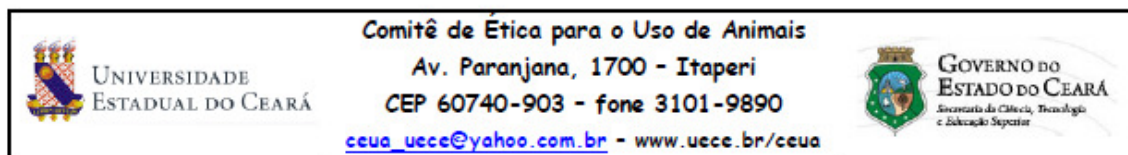
YABUKI, A.; MITANI, S.; SAWA, M.; MIZUKAMI, K.; FUJIKI, M.; YAMATO, O. A comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: Induction of cyclooxygenases. *Research in Veterinary Science*, v.93, n.2, p.892-897, 2012.

ZEISBERG, E. M.; POTENTA, S. E.; SUGIMOTO, H.; ZEISBERG, M.; KALLURI, R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.19, p.2282-2287, 2008.

ZHANG, G.; MOORHEAD, P. J.; EL NAHAS, A. M. Myofibroblasts and progression of experimental glomerulonephritis. *Experimental Nephrology*, v.3, p.308-318, 1995.

ZOJA, C.; ABBATE, M.; REMUZZI, G. Progression of chronic kidney disease: insights from animal models. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v.15, p.250-257, 2006.

APÊNDICE A



CERTIFICADO

Certificamos que o **Projeto de Pesquisa** intitulado **“Alterações morfofuncionais de rins de gatos com insuficiência renal crônica”** registrado sob o número **11585871-7/10**, tendo como pesquisador **principal Janáina Serra Azul Monteiro Evangelista** está de acordo com os **Princípios Éticos de Experimentação Animal** adotados pela **Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará** sendo aprovado em 14 de junho de 2012. Este certificado expira-se em 14 de junho de 2016.

Fortaleza, 14 de junho de 2012.

José Mário Girão Abreu
Coordenador CEUA-UECE