NATALIA GARLA NASCIMENTO

**Avaliação da progressão da taxa de filtração glomerular pela
dimetilarginina simétrica em cães com doença renal crônica
submetidos à terapia com células-tronco mesenquimais**

São Paulo

2019

NATALIA GARLA NASCIMENTO

Avaliação da progressão da taxa de filtração glomerular pela dimetilarginina simétrica em cães com doença renal crônica submetidos à terapia com células-tronco mesenquimais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Márcia Mery Kogika

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2019

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3773
FMVZ

Garla Nascimento, Natalia
Avaliação da progressão da taxa de filtração glomerular pela dimetilarginina simétrica em cães com doença renal crônica submetidos à terapia com células-tronco mesenquimais / Natalia Garla Nascimento. – 2019.
106 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Mery Kogika.

1. Biomarcadores renais. 2. Terapia celular. 3. Diagnóstico precoce. 4. Nefropatia. 5. Canina. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da Progressão da Taxa de Filtração Glomerular pela Dimetilarginina Simétrica, em Cães com Doença Renal Crônica submetidos à Terapia com Células-tronco Mesenquimais", protocolada sob o CEUA nº 8105020217, sob a responsabilidade de **Márcia Mery Kogika e equipe; Natalia Garla Nascimento; Fernanda Chicharo Chacar** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/03/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of Glomerular Filtration Rate Progression by Symmetric Dimethylarginine in Dogs with Chronic Kidney Disease submitted to Mesenchymal Stem Cell Therapy", utilizing 32 Dogs (males and females), protocol number CEUA 8105020217, under the responsibility of **Márcia Mery Kogika and team; Natalia Garla Nascimento; Fernanda Chicharo Chacar** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/15/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2017** a **03/2019**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **HOVET/FMVZ/USP**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 18 anos**

N: **32**

Linhagem: **não se aplica**

Peso: **2 a 40 kg**

Resumo: A doença renal crônica ocorre pelo comprometimento funcional e/ou estrutural de um ou ambos os rins e apresenta caráter irreversível e progressivo. Acomete principalmente cães idosos, mas pode ocorrer em mais jovens, como doença renal crônica juvenil (POLZIN, 2011; BARTGES, 2012). Sua prevalência em cães varia conforme o local de estudo, havendo referências de 0,05 a 3,74% (O'NEILL et al., 2013). A taxa de filtração glomerular é a medida que melhor avalia a função renal e apresenta boa correlação com a gravidade da DRC, porém sua avaliação apresenta custo elevado, além de ser de difícil realização (necessidade de múltiplas coletas de sangue, coleta de urina em 24 horas), além disso, a TFG pode ser influenciada por diversos fatores tais como sexo, idade, raça, ingestão de proteína, grau de hidratação, balanço de sódio e ritmo circadiano (KAMPA, 2003; BASTOS, 2011). Atualmente a substância que melhor estima a TFG é a creatinina sérica, porém sua interpretação deve ser cuidadosa, pois além de sofrer pequena secreção pelos túbulos renais (principalmente em machos), seus valores sofrem a interferência de variáveis como musculatura e peso corpóreo, tipo de dieta, idade e grau de hidratação (HEIENE, 1998; BRAUN et al, 2003; VON HENDY-WILLSON, 2011; YERRAMILLI et al, 2016). Além disso, a azotemia (aumento de ureia e creatinina) só é observada quando cerca de 75% dos néfrons já foram perdidos. Neste ponto, a terapia torna-se limitada, e cães com DRC nos estágios mais avançados apresentam mau prognóstico (GRAUER, 2005; VON HENDY-WILLSON, 2011). Assim, surge a necessidade de novos biomarcadores que melhor estimem a medida de TFG, bem como possam fazer uma avaliação mais precoce. A determinação da dimetilarginina simétrica (SDMA) foi inicialmente estudada na medicina humana (KAKIMOTO, 1970). Foi observado que sua concentração sérica aumentava em pacientes renais crônicos, e que relacionava-se com o grau de insuficiência renal (WAHBI, 2001; FLECK, 2001). A SDMA é produzida constantemente no núcleo das células, por meio da metilação dos resíduos de arginina das proteínas, pela ação de enzimas arginina metiltransferases, sem sofrer influências de outras doenças. Sua liberação ocorre após a proteólise, sendo eliminada quase exclusivamente por filtração glomerular e sem reabsorção tubular, assim sua concentração sérica é influenciada pela TFG (KIELSTEIN, 2006; PEDERSEN, 2006; YERRAMILLI et al, 2016). Estudos em cães demonstraram correlação direta entre a concentração sérica de creatinina e os níveis de SDMA (PEDERSEN, 2006), sua determinação não foi influenciada por idade ou massa muscular, evidenciando assim a possibilidade da SDMA ser um biomarcador de TFG mais confiável que a creatinina sérica (HALL et al, 2015). Nabity et al (2015) em seu estudo, demonstrou aumento dos níveis de SDMA quando a redução da TFG era inferior a 30%, enquanto que a alteração de creatinina era observada quando TFG menor que 50%, evidenciando a possibilidade do diagnóstico precoce. Em 2016, a IRIS (International Renal Interest Society) incluiu em suas diretrizes para estadiamento da DRC a mensuração da SDMA. Devido à terapia atual para DRC ser limitada ao manejo conservador, estudos, principalmente em humanos, têm sido realizados para avaliar a possibilidade de terapia com uso de células-tronco. Estudos em ratos como modelo experimental de DRC (nephrectomia de 5/6) com uso de terapia com células-tronco

mesenquimais, evidenciou-se menor progressão da doença renal, sendo isto associado à redução da produção de interleucinas (CAVAGLIERI et al, 2009). Assim, as células-tronco parecem ter um efeito renoprotetor, associado à sua ação imunomoduladora, por redução da inflamação local e sistêmica (menor expressão de citocinas pró-inflamatórias e maior de citocinas anti-inflamatórias) (MAZHARI, HARE, 2007). Uma fonte de células-tronco mesenquimais usada atualmente é o cordão umbilical de humanos, sendo que as células podem ser obtidas do sangue ou até mesmo do estroma do cordão (geleia de Wharton), estas células embora já adultas são ainda bem jovens, apresentando boa alternativa para uso em terapia (BAKSH, 2004; AZANDEH, 2012). O uso em diferentes espécies tem sido feito com segurança, provavelmente por sua ação imunomoduladora (CAO et al, 2010; ZUCONI et al, 2012).

Local do experimento: Os animais serão provenientes do atendimento da rotina clínica do Serviço de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET/FMVZ-USP)

São Paulo, 06 de março de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GARLA NASCIMENTO, Natalia

Título: **Avaliação da progressão da taxa de filtração glomerular pela dimetilarginina simétrica em cães com doença renal crônica submetidos à terapia com células-tronco mesenquimais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força no caminho, pela saúde e por todas as oportunidades que me permitiu vivenciar.

Aos meus pais, Vanderlei e Aparecida, que me apoiaram sempre, me deram condições para ir atrás de cada sonho e aos meus irmãos, Rodrigo e Paula, pelo incentivo e amizade.

Agradeço ao meu marido Daniel de Brito Nascimento, pelo amor, companheirismo, por ser meu alicerce e sempre me impulsionar a evoluir. Agradeço ao meu filho de quatro patas, Dexter, por cada olhar de carinho e por ficar sempre acordado comigo nas horas de estudo.

À profa. Márcia Mery Kogika, por me abrir as portas e confiar em minhas mãos sua pesquisa, pelo apoio em todas às questões acadêmicas e profissionais, pelos ensinamentos e por sempre nos incentivar a buscar o melhor caminho.

Aos amigos da “sala dos pós-graduandos” que me permitiram trilhar com eles esse caminho sempre com generosidade em compartilhar conhecimentos, bom humor e tornando os dias mais leves, em especial à Fernanda Chicharo Chacar, à Cecília S. Zarif Hudson, à Mariana Porsani, à Andressa Rodrigues Amaral e aos amigos da equipe da professora Márcia Mery, Douglas Segalla Caragelasco, Ricardo Duarte Lopes e Fernanda Chicharo Chacar.

Às técnicas do Laboratório Clínico do HOVET, Clara Satsuki Mori, Creide Donizete Costa, Cláudia Regina Stricagnolo, Maria Helena S. Pelissari e Edna Santana dos Santos, por me orientaram na execução de exames, sempre à disposição para qualquer necessidade que surgisse durante a pesquisa e pela amizade. Às médicas veterinárias que são ou foram parte do serviço de Clínica Médica do HOVET USP, Khadine Kanayama, Denise Maria Nunes Simões, Bruna Maria P. Coelho, Andrea Ferreira aos residentes e ao enfermeiro Milton, pelo apoio nos atendimentos dos animais.

Aos professores da FMVZ USP, em especial aos professores do departamento de Clínica Médica, por todos os ensinamentos e pelo grande exemplo.

Aos tutores dos animais que colaboram com a execução deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio pesquisa referente ao Projeto Temático (Processo nº 2010/19012-0) e à Professora Lucia da Conceição Andrade, responsável pelo referido projeto, bem como a todos do seu laboratório da Faculdade de Medicina da USP (FM USP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

GARLA NASCIMENTO, N. **Avaliação da progressão da taxa de filtração glomerular pela dimetilarginina simétrica em cães com doença renal crônica submetidos à terapia com células-tronco mesenquimais.** 2019. 106 f.
Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A doença renal crônica ocorre pelo comprometimento funcional e/ou estrutural de um ou ambos os rins e apresenta caráter irreversível e progressivo. A taxa de filtração glomerular é a medida que melhor avalia a função renal e apresenta boa correlação com a gravidade da DRC, porém fatores como custo e técnica podem limitar sua realização. A creatinina sérica (sCr) é o biomarcador indireto utilizado na rotina clínica que mais de aproxima da TFG, porém sua interpretação deve ser cuidadosa pois esta pode ser influenciada por fatores extrarrenais. Além disso, a azotemia só é observada quando cerca de 75% da massa de néfrons já foi perdida, correspondendo à diminuição de 50-60% da função renal. Neste ponto, a terapia torna-se limitada, e cães com DRC nos estágios mais avançados apresentam mau prognóstico. A dimetilarginina simétrica (SDMA), um novo biomarcador indireto de taxa de filtração glomerular (TFG), demonstrou boa correlação com a sCr e com a TFG, bem como maior precocidade em identificar alterações de função glomerular. Em 2015, a IRIS (International Renal Interest Society) incluiu em suas diretrizes para estadiamento da DRC a mensuração da SDMA. Devido à terapia atual para DRC ser limitada ao manejo conservador, a terapia com células-tronco tem demonstrado potencial de uso por apresentar efeito renoprotetor, associado à sua ação imunomoduladora. Uma fonte de células-tronco mesenquimais (CTM) é o cordão umbilical, estas células embora já adultas são ainda bem jovens, apresentando grande capacidade de diferenciação celular e, portanto, boa alternativa para uso em terapia. Este estudo avaliou sequencialmente, pelo período de 12 a 15 meses (ou óbito), 27 cães com DRC estágios 2 (Grupo A) ou 3 (Grupo B). Ambos foram divididos de forma randomizada entre grupos que receberam terapia com CTM (Grupo A – CTM, n = 6 e Grupo B – CTM, n = 8) e aqueles que receberam apenas solução fisiológica, controle (Grupo A – SF, n = 6; Grupo B – SF, n = 7). Foram avaliadas mensalmente ($\pm$ 15 dias) a concentração de sCr e trimestralmente ($\pm$ 20 dias) a SDMA sérica. Não foi possível identificar alterações das concentrações de

SDMA ou sCr com o uso das CTM, ao longo do acompanhamento, no Grupo A ($P = 0,3198$ e $P = 0,9035$, respectivamente) ou no Grupo B ($P = 0,7640$ e $P = 0,2306$, respectivamente). Associa-se isso à heterogeneidade dos cães no estágio 3, havendo a possibilidade ainda da necessidade de maior tempo de acompanhamento (muitos cães evoluíram a óbito), bem como maior número de animais avaliados em cada subgrupo. SDMA apresentou correlação moderada com sCr ($r = 0,6186$; $P < 0,0001$), suas concentrações no entanto, apresentaram variações individuais cujas causas ainda são pouco conhecidas, assim a importância da avaliação sequencial. Mau prognóstico foi observado quanto maior a concentração de SDMA.

Palavras-chave: Biomarcadores renais. Terapia celular. Diagnóstico precoce. Nefropatia. Canina.

ABSTRACT

GARLA NASCIMENTO, N. **Evaluation of glomerular filtration rate progression by symmetric dimethylarginine in dogs with chronic kidney disease submitted to mesenchymal stem cell therapy.** 2019. 106 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by functional and/or structural impairment of one or both kidneys and this impairment is irreversible and progressive. The glomerular filtration rate (GFR) is the best assessment of renal function and well correlates with CKD severity but factors such as cost and technique may limit its achievement. Serum creatinine (sCr) is the indirect biomarker most used in clinic routine showing a good correlation with GFR, but its interpretation must be careful since it can be influenced by extra-renal factors. In addition, azotemia is only observed when about 75% of nephron mass has already been lost, corresponding to 50-60% decreased renal function. At this point therapy becomes limited and dogs in an advanced CKD stage present poor prognosis. Symmetric dimethylarginine is a new GFR indirect biomarker that has shown a good correlation with sCr and GFR and an earlier recognition of renal function when compared to sCr. In 2016 the International Renal Interest Society included a preliminary staging based on SDMA in the IRIS CKD guidelines. Current CKD therapy is limited to conservative management, so mesenchymal stem cell (MSC) renoprotective effect associated to an immunomodulatory action has been studied as a possible therapy. The umbilical cord is a rich source of MSC and these are young cells what contributes to a better response to therapy. This study sequentially evaluated for a 12 to 15-month period (or death), 27 dogs in CKD stages 2 (Group A) or 3 (Group B). Both groups were randomized into subgroups that received MSC therapy (Group A - MSC, n = 6 and Group B - MSC, n = 8) and those receiving only physiological solution, control group (Group A - PS, n = 6; Group B - PS, n = 7). The concentration of sCr was monthly assessed ($\pm$ 15 days) and SDMA was evaluated each three months ($\pm$ 20 days). It was not possible to identify changes in SDMA or sCr concentrations with MSC therapy during the follow-up in Group A ($P = 0.3198$ and $P = 0.9035$, respectively) or in Group B ($P = 0.7640$ and $P = 0.2306$, respectively). This may be associated with the heterogeneity of dogs in stage 3, with a need of longer follow-up period (many

dogs died during the study), as well as higher number of animals evaluated in each group. SDMA showed a moderate correlation with sCr ($r = 0.6186$; $P < 0.0001$); however, their concentrations have individual variations whose causes are still not well known, then the need of the sequential evaluation. Poor prognosis was observed when the concentration of SDMA was higher.

Keywords: Renal biomarkers. Stem cell therapy. Early diagnosis. Nephropathy, Canine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva de relação entre a taxa de filtração glomerular (TFG) e a creatinina sérica.....	28
Figura 2 - Classificação em estágios da doença renal crônica (DRC) em cães, com base nas avaliações de creatinina sérica e SDMA sérica, conforme IRIS, 2016.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores individuais da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$), creatinina (sCr) (mg/dL) e ureia (mg/dL), dos animais do Grupo C; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.....45

Tabela 2 - Valores individuais da concentração sérica de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo A - SF, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.....48

Tabela 3 - Valores individuais da concentração sérica de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo A - CTM, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.....49

Tabela 4 - Valores individuais da concentração sérica de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo A - SF, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.....50

Tabela 5 - Valores individuais da concentração sérica de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo A - CTM, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.....51

Tabela 6 - Valores individuais da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$), creatinina (sCr) (mg/dL) e ureia (sU) (mg/dL), dos cães do Grupo A – SF, nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; bem como estatística descritiva

dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo (mín.) e máximo (máx.), e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.....52

Tabela 7 - Valores individuais da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) (µg/dL), creatinina (sCr) (mg/dL) e ureia (sU) (mg/dL), dos cães do Grupo A – CTM, nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo (mín.) e máximo (máx.), e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.52

Tabela 8 - Valores das faixas de SDMA sérica correspondentes aos estágios da DRC (IRIS, 2016), dos cães do Grupo A – SF nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; relacionados com a concentração de creatinina sérica (sCr) e escore de massa muscular (EMM). São Paulo – 2019.55

Tabela 9 - Valores das faixas de SDMA sérica correspondentes aos estágios da DRC (IRIS, 2015), dos cães do Grupo A – CTM nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; relacionados com a concentração de creatinina sérica (sCr) e escore de massa muscular (EMM). São Paulo – 2019.56

Tabela 10 - Valores individuais da concentração sérica de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo B - SF, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.....67

Tabela 11 - Valores individuais da concentração sérica de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo B - CTM, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.....68

Tabela 12 - Valores individuais da concentração sérica de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo B - SF, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro

padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.....69

Tabela 13 - Valores individuais da concentração sérica de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo B – CTM, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.....70

Tabela 14 - Valores individuais da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) (µg/dL), creatinina (sCr) (mg/dL) e ureia (sU) (mg/dL), dos cães do Grupo B – SF (B1 a B7), nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo (mín.) e máximo (máx.), e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.71

Tabela 15 - Valores individuais da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) (µg/dL), creatinina (sCr) (mg/dL) e ureia (sU) (mg/dL), dos cães do Grupo B – CTM (B8 a B15), nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo (mín.) e máximo (máx.), e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.72

Tabela 16 - Valores das faixas de SDMA sérica correspondentes aos estágios da DRC (IRIS, 2015), dos cães do Grupo B – SF nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; relacionados com a concentração de creatinina sérica (sCr) e escore de massa muscular (EMM) respectivos. São Paulo – 2019.74

Tabela 17 - Valores das faixas de SDMA sérica correspondentes aos estágios da DRC (IRIS, 2015), dos cães do Grupo B – CTM nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; relacionados com a concentração de creatinina sérica (sCr) e escore de massa muscular (EMM) respectivos. São Paulo – 2019.75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Variação individual das concentrações séricas de SDMA ($\mu\text{g/dL}$) nos cães do Grupo A – SF (DRC estágio 2 que receberam terapia placebo), nos momentos M1 a M5. São Paulo, 2019.	58
Gráfico 2 - Variação individual das concentrações séricas de SDMA ($\mu\text{g/dL}$) nos cães do Grupo A – CTM (DRC estágio 2 que receberam terapia com células-tronco mesenquimais), nos momentos M1 a M5. São Paulo, 2019.	58
Gráfico 3 - Variação média ($\pm$ DP) das concentrações séricas de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo A – SF em comparação com Grupo A – CTM, durante período de estudo (T0 a T12). São Paulo, 2019.	59
Gráfico 4 - Delta (sCr (última – T0) / sCr T0) das concentrações séricas de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo A – SF em comparação com Grupo A – CTM. São Paulo, 2019.	60
Gráfico 5 - Variação média ($\pm$ DP) das concentrações séricas de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$) dos cães do Grupo A – SF em comparação com Grupo A – CTM, durante período de estudo (M1 a M5). São Paulo, 2019.	60
Gráfico 6 - Delta (SDMA (última – T0) / SDMA T0) das concentrações séricas de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$) dos cães do Grupo A – SF em comparação com Grupo A – CTM. São Paulo, 2019.	61
Gráfico 7 - Variação média ($\pm$ DP) das concentrações séricas de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo A – SF em comparação com Grupo A – CTM, durante período de estudo (T0 a T12). São Paulo, 2019.	62
Gráfico 8 - Delta (sU (última – T0) / sU T0) das concentrações séricas de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo A – SF em comparação com Grupo A – CTM. São Paulo, 2019.	62
Gráfico 9 - Variação individual das concentrações séricas de SDMA ($\mu\text{g/dL}$) nos cães do Grupo B – SF (DRC estágio 3 que receberam terapia com solução fisiológica) (B1 a B7), nos momentos M1 a M5. São Paulo, 2019.	76

Gráfico 10 - Variação individual das concentrações séricas de SDMA ($\mu\text{g/dL}$) nos cães do Grupo B – CTM (DRC estágio 3 que receberam terapia com células-tronco mesenquimais) (B8 a B15), nos momentos M1 a M5. São Paulo, 2019.	77
Gráfico 11 - Variação média ($\pm$ DP) das concentrações séricas de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo B – SF em comparação com Grupo B – CTM, durante período de estudo (T0 a T12). São Paulo, 2019.	78
Gráfico 12 - Delta (sCr (última – T0) / sCr T0) das concentrações séricas de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo B – SF em comparação com Grupo B – CTM. São Paulo, 2019.	79
Gráfico 13 - Variação média ($\pm$ DP) das concentrações séricas de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$) dos cães do Grupo B – SF em comparação com Grupo B – CTM, durante período de estudo (M1 – M5). São Paulo, 2019.	80
Gráfico 14 - Delta (SDMA (último – T0) / SDMA T0) das concentrações séricas de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$) dos cães do Grupo B – SF em comparação com Grupo B – CTM. São Paulo, 2019.	80
Gráfico 15 - Variação média ($\pm$ DP) das concentrações séricas de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo B – SF em comparação com Grupo B – CTM, durante período de estudo (T0 – T12). São Paulo, 2019.	81
Gráfico 16 - Delta (sU (último – T0) / sU T0) das concentrações séricas de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo B – SF em comparação com Grupo B – CTM. São Paulo, 2019.	82
Gráfico 17 - Coeficiente de correlação da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$) e creatinina sérica (mg/dL), dos cães do Grupo A e B (cães nos estágios 2 e 3 da DRC, segundo <i>IRIS</i> , 2016) ($r = 0,6186$; $P < 0,0001$). São Paulo – 2019.	82
Gráfico 18 - Coeficiente de correlação da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$) e creatinina sérica (mg/dL), dos cães do Grupo C (controle) ($r = 0,2440$; $P = 0,4448$). São Paulo – 2019.	83

Gráfico 19 - Curva de sobrevida conforme as faixas de concentrações séricas de creatinina (sCr, mg/dL), determinadas para estadiamento da DRC, segundo IRIS, 2016, dos cães incluídos nos Grupos A e B (cães nos estágios 2 e 3 da DRC). São Paulo – 2019.	83
Gráfico 20 - Curva de sobrevida conforme o intervalo de concentrações séricas da dimetilarginina simétrica (SDMA, µg/dL), sendo de SDMA 14 – 24 µg/dL, SDMA 25 – 44 µg/dL e SDMA ≥ 45 µg/dL, dos cães do Grupo A e B (cães nos estágios 2 e 3 da DRC, segundo <i>IRIS</i> , 2016, pela concentração de creatinina sérica). São Paulo – 2019.	84
Gráfico 21 - Curva de sobrevida conforme a razão SDMA/sCr, sendo razão SDMA/sCr > 10 indicador de pior prognóstico, dos cães do Grupo A e B (cães nos estágios 2 e 3 da DRC, segundo <i>IRIS</i> , 2016). São Paulo – 2019.	84
Gráfico 22 - Curva de sobrevida conforme a terapia instituída sendo considerado como CTM os cães que receberam a terapia com células-tronco mesenquimais (Grupo B – CTM) e SF aqueles que receberam a terapia de manutenção conservadora (Grupo B – SF). São Paulo – 2019.	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Identificação dos cães clinicamente saudáveis do grupo controle (GRUPO C) de C1 a C12, de acordo com idade (meses), definição racial e sexo, atendidos no HOVET – USP. São Paulo, 2019.....	44
Quadro 2 - Identificação dos cães com doença renal crônica do GRUPO A (estágio 2) de A1 a A12, divididos conforme os subgrupos em A – SF (animais que receberam aplicação de solução fisiológica) e A – CTM (cães que receberam a aplicação de células-tronco mesenquimais), de acordo com idade (meses), peso (kg), definição racial, sexo e ocorrência de óbito no período de estudo, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, 2019.	46
Quadro 3 - Eventos secundários à disfunção renal que ocorreram em alguns cães do Grupo A (A – SF e A – CTM), durante o período de T0 a T12, bem como terapia preconizada. São Paulo, 2019.	46
Quadro 4 - Escore de massa muscular (EMM: 0 - 3) dos cães do Grupo A (A1 a A12), classificados em sub-grupos A-SF e A-CTM, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, 2019.	47
Quadro 5 - Escore de condição corpórea (ECC: 1 - 9) dos cães do Grupo A (A1 a A12), classificados em sub-grupos A-SF e A-CTM, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, 2019.	47
Quadro 6 - Resumo das alterações nas concentrações de creatinina sérica (sCr) e dimetilarginina simétrica sérica (SDMA), bem como avaliação da evolução de estágio da doença renal crônica (DRC), nos cães do Grupo A – SF e CTM. São Paulo, 2019.	57
Quadro 7 - Identificação dos cães com doença renal crônica do GRUPO B (estágio 3) de B1 a B15, divididos conforme os subgrupos em B – SF (animais que receberam aplicação de solução fisiológica) e B – CTM (cães que receberam a	

aplicação de células-tronco mesenquimais), de acordo com idade (meses), peso (kg), definição racial, sexo e ocorrência de óbito no período de estudo, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, 2019.63

Quadro 8 - Eventos secundários à disfunção renal que ocorreram em alguns cães do Grupo B – SF (cães no estágio 3 da DRC que receberam solução fisiológica placebo) e do Grupo B – CTM (cães no estágio 3 da DRC que receberam terapia com células-tronco mesenquimais), durante os períodos de T0 a T12, bem como terapia preconizada. São Paulo, 2019.65

Quadro 9 - Escore de massa muscular (EMM: 0 - 3) dos cães do Grupo B (doentes renais crônicos estágio 3), classificados em subgrupos B - SF (cães que receberam solução fisiológica) e B – CTM (cães que receberam células-tronco mesenquimais), nos períodos de acompanhamento do estudo (T0 a T12), atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, 2019.66

Quadro 10 - Escore de condição corpórea (ECC: 1 - 9) dos cães do Grupo B (DRC estágio 3), classificados em subgrupos B - SF (cães que receberam solução fisiológica) e B – CTM (cães que receberam células-tronco mesenquimais), nos períodos de acompanhamento do estudo (T0 a T12), atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, 2019.66

Quadro 11 - Resumo das alterações nas concentrações de creatinina sérica (sCr) e dimetilarginina simétrica sérica (SDMA), bem como avaliação da evolução de estágio da doença renal crônica (DRC), nos cães do Grupo B – SF e CTM. São Paulo, 2019.76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	DOENÇA RENAL CRÔNICA	24
2.2	DIAGNÓSTICO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	25
2.3	TERAPIA DA DOENÇA RENAL CRÔNICA	31
3	OBJETIVOS	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	GRUPO DE ESTUDO	35
3.1.1	Grupo A.....	36
3.1.2	Grupo B.....	36
3.1.3	Grupo C.....	36
3.1.4	Acompanhamento	37
3.2	MÉTODOS	37
3.2.1	Coleta, processamento e armazenamento de material biológico	37
3.2.2	Exames Laboratoriais.....	38
3.2.3	Outros Exames.....	39
3.2.4	Terapia com Células-Tronco Mesenquimais	40
3.2.5	Análise estatística	43
5	RESULTADOS	44
5.1	Grupo C (controle).....	44
5.2	Grupo A (cães no estágio 2 da DRC).....	45
5.3	GRUPO B (cães com DRC estágio 3).....	63
5.4	EFEITOS ADVERSOS À APLICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO	86
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÃO.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) ocorre pelo comprometimento funcional e/ou estrutural que pode acometer um ou ambos os rins, e que persiste por três meses ou mais. Compreende desde um pequeno dano estrutural em um dos rins apenas, até à grande perda de néfrons de ambos os rins, sendo que essas lesões são irreversíveis e progressivas (POLZIN, 2011; BARTGES, 2012).

Atualmente, o diagnóstico da DRC é baseado em avaliações de bioquímica sérica (ureia e creatinina), urinálise e exames de imagem, como a ultrassonografia, associados às manifestações clínicas (POLZIN, 2011). Devido à grande reserva funcional e hipertrofia compensatória dos néfrons secundária à lesão renal, os sinais clínicos e a azotemia só são observados tardiamente, quando a lesão atinge em média 75% dos néfrons.

Neste ponto, a terapia torna-se muito limitada, levando a mau prognóstico (GRAUER, 2005; VON HENDY-WILLSON; PRESSLER, 2011). Evidencia-se então a necessidade de novas estratégias para diagnóstico da DRC que possibilitariam o estabelecimento precoce de terapias, a fim de retardar a velocidade de progressão da DRC (LEES, 2004).

A dimetilarginina simétrica (SDMA) tem sido estudada atualmente como um biomarcador indireto de taxa de filtração glomerular (TFG), por ser quase que exclusivamente eliminada via filtração glomerular e não sofrer secreção ou reabsorção tubular, recebendo assim influência apenas da TFG (KIELSTEIN et al., 2006; PEDERSEN et al. 2016). Estudos realizados em cães, gatos e humanos demonstraram correlação positiva entre a determinação da SDMA e da creatinina sérica (PEDERSEN et al., 2006; HALL et al., 2016b), sendo que a SDMA apresentou maior precocidade em detectar alterações de função renal, quando apenas 30% da TFG estava comprometida (NABITY et al., 2015). A *International Renal Interest Society (IRIS)* incluiu em suas últimas diretrizes a SDMA como novo parâmetro a ser pesquisado quando da suspeita de DRC (IRIS, 2016). Novos estudos, no entanto ainda são incentivados a fim de definir e interpretar adequadamente os resultados de SDMA encontrados.

Estabelecendo-se o diagnóstico precoce da DRC, surge a necessidade e possibilidade de terapias e intervenções que permitam o retardo e/ou estabilização da progressão da doença. Atualmente as terapias recomendadas baseiam-se no

suporte frente às manifestações clínicas, tratando-se, portanto do manejo conservador. Embora sejam fundamentais para retardar o avanço da doença, não produzem estagnação da progressão por maiores períodos, o que garantiria maior longevidade a esses pacientes.

A terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) utilizando ratos como modelo experimental de DRC (nephrectomia 5/6) levou a redução da taxa de progressão da doença (CAVAGLIERI et al., 2009), devido a propriedades imunomoduladoras apresentadas pelas CTM, que culminam no controle do processo inflamatório renal e sistêmico (MAZHARI; HARE, 2007). Embora ainda não totalmente elucidado, suscita-se que o papel das CTMs na DRC possa estar relacionado ao retardo da progressão da doença, regeneração tecidual ou recuperação funcional renal (SEMEDO et al., 2009; CAVAGLIERI et al., 2009; MORIGI; BENIGNI, 2013; CAPCHA, 2015; CÓNDOR et al., 2016; LEE et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

Em 1827, o cientista Richard Bright estabeleceu pela primeira vez uma relação causal entre a doença renal intrínseca e as alterações clínicas, bioquímicas e fisiológicas associadas ao estado urêmico. Foi então definida a *doença de Bright*, que posteriormente, com o entendimento da fisiopatologia, foi substituída pelo termo insuficiência renal crônica e por último, doença renal crônica (DRC), como se utiliza até hoje (BRICKER; MORRIN; KIME, 1997; ZATZ, 2012).

Três componentes caracterizam e definem a DRC e devem ser considerados quando do seu diagnóstico, são eles o comprometimento funcional e/ou estrutural (uni ou bilateral), e a persistência dessas alterações por três meses ou mais (POLZIN, 2011a; BARTGES, 2012). A DRC tem caráter irreversível e de progressão espontânea, pois a perda permanente de néfrons leva à sobrecarga funcional dos remanescentes, o que culmina com sua lesão e substituição por tecido fibrótico. Assim, não há necessariamente um processo ativo contínuo para que haja progressão doença. Porém, a DRC pode apresentar algumas complicações pré ou pós-renais, bem como lesões ativas como desidratação, obstruções e pielonefrites, respectivamente, que aceleram a progressão da doença, no entanto estes processos podem ser reversíveis (POLZIN, 2017).

A prevalência da DRC em cães varia na dependência do local e população estudados. Em 1986, MacDougall et al. realizou um questionário prospectivo multicêntrico no Reino Unido tendo encontrado a prevalência de 0,05% de DRC em cães. Posteriormente, Sosnar et al. (2003) em seu estudo retrospectivo dos casos recebidos na Universidade da República Tcheca entre 1999 e 2001, estimou a prevalência de 3,74% em cães. Mais recentemente, O'NEILL et al. (2013), em seu estudo com cães realizado no Reino Unido, encontrou a prevalência aparente (IC 95%) (prevalência dos diagnósticos realizados) de 0,21% (0,19 – 0,24%) e a prevalência verdadeira (prevalência de todos os casos) de 0,37% (0,02 – 1,44%) (MACDOUGALL et al., 1986; SOSNAR et al., 2003; O'NEILL et al., 2013).

Ainda neste estudo, 63,6% dos cães diagnosticados com DRC apresentavam idade maior que 12 anos (O'NEILL et al., 2013). Outro estudo realizado no Centro Médico Veterinário da Universidade de Minnesota observou-se

uma prevalência da DRC de 10% em cães acima de 15 anos (POLZIN, 2011b). Portanto, a DRC pode atingir qualquer faixa etária, porém apresenta maior prevalência entre cães idosos.

As etiologias da DRC podem ser separadas em três condições principais: familiar, congênita e adquirida. A DRC juvenil pode ser de origem adquirida ou congênita, quando congênita, esta pode ser de causa hereditária (familiar) ou não. Dentre as principais causas familiares estão a displasia renal, glomerulopatias primárias, doença renal policística, amiloidose e as glomerulonefrites (LESS, 2007; POLZIN, 2017).

A doença renal crônica adquirida ocorre também por vários fatores, dentre eles doenças imunológicas (lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite, vasculites), amiloidose, neoplasia, nefrotoxinas, isquemia renal, causas inflamatórias ou infecciosas (pielonefrite, leptospirose), obstruções urinárias, entre outras (GRAUER, 2010).

Embora possam existir diferentes etiologias, torna-se difícil identificá-las, pois normalmente o diagnóstico da DRC é tardio. Com a progressão da doença, as mudanças impostas pelas diferentes etiologias da DRC são substituídas por adaptações e compensações morfológicas e funcionais similares. Assim o diagnóstico precoce da DRC poderia permitir o reconhecimento dessas lesões e, portanto, a identificação das diversas etiologias (POLZIN, 2011b).

2.2 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

O diagnóstico da DRC baseia-se em avaliações de bioquímica sérica (ureia e creatinina), urinálise e exames de imagem, como a ultrassonografia, associados às manifestações e histórico clínicos do animal (POLZIN, 2011a).

A azotemia (aumento das concentrações séricas de ureia e/ou creatinina), bem como as manifestações clínicas associadas a ela são observadas tardiamente, quando em média 75% do número dos néfrons foi perdido (GRAUER, 2005; VON HENDY-WILLSON; PRESSLER, 2011; LEFEBVRE, 2011).

Para auxiliar no diagnóstico, indicação de prognóstico e manejo da DRC, em 1998, a IRIS desenvolveu as primeiras recomendações para cães e gatos com DRC, bem como um sistema para estadiamento da DRC (ELLIOTT, 2007). A DRC em cães é classificada em quatro estágios conforme a faixa de mensuração da

creatinina sérica (sCr) em jejum e em animais estáveis. No estágio 1, não existe alteração da creatinina acima de seu valor de referência (sCr < 1,4mg/dl), a partir do estágio 2 ocorre a elevação da creatinina para além desse valor, ocorrendo o aumento gradativo com a evolução dos estágios (estágio 2: sCr = 1,4 – 2,0 mg/dl; estágio 3: sCr = 2,1 – 5,0; estágio 4: sCr > 5,0 mg/dl) (IRIS, 2016).

Há ainda subestadiamentos da DRC que classificam com base na presença de proteinúria e na pressão arterial sistólica (PAS). Em relação à proteinúria são considerados três subestágios em cães: não proteinúrico (RPC < 0,2), proteinúria limítrofe (RPC entre 0,2-0,5) e proteinúrico (RPC > 0,5). Conforme a pressão arterial sistólica/risco de lesão em órgão-alvo são classificados em: normotensos/risco mínimo (PAS < 150mmHg), hipertensão limítrofe/baixo risco (PAS entre 150-159 mmHg), hipertenso/risco moderado (PAS: 160-179 mmHg) e hipertensão grave/alto risco (PAS > 180 mmHg) (IRIS, 2016).

Em 2015, foi realizada uma modificação nas recomendações para estadiamento da DRC que incluiu a avaliação da dimetilarginina simétrica sanguínea (SDMA). Estudos demonstravam que este seria um biomarcador indireto de taxa de filtração glomerular (TFG) mais sensível que a creatinina sérica (IRIS, 2016).

A TFG é considerada na nefrologia a medida que melhor avalia a função renal, permitindo avaliar a gravidade e a progressão da doença renal (LEVEY, 1989; HEIENE; MOE, 1999; LEFEBVRE, 2011).

Sua avaliação, entretanto, é subutilizada na rotina clínica veterinária, o que pode ser justificado por fatores relativos às técnicas disponíveis, custo, dificuldade de realização da técnica, necessidade de múltiplas coletas de sangue, coleta de urina durante o período de 24 horas, o que exigiria que os animais ficassem em gaiolas metabólicas ou que fossem cateterizados em vários momentos para coleta de urina (MOE; HEIENE, 1995; VON HENDY-WILLSON; PRESSLER, 2011).

Além disso, a TFG pode ser influenciada por fatores como sexo, idade, raça, ingestão proteica, hidratação, balanço de sódio e ritmo circadiano, tornando-se inapropriado estabelecer um intervalo de referência único para as variadas raças de cães (KAMPA et al., 2003; BASTOS; KIRSZTAJN, 2011; VON HENDY-WILLSON; PRESSLER, 2011).

Como alternativas às mensurações da TFG, na prática clínica são utilizados biomarcadores que permitem uma estimativa da função renal. O conceito de biomarcador foi definido pelo grupo de estudo do *National Institutes of Health (NIH)*,

em 1998, como uma “característica objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica”, ou seja, trata-se de um indicador que pode ser usado para diagnóstico e monitoramento de doenças, bem como de respostas a tratamentos estabelecidos (FRANGOIANNIS, 2012).

Para estimar a TFG, um marcador ideal necessita ser livremente filtrado pelos glomérulos, não apresentar ligação às proteínas plasmáticas, não ser reabsorvido ou secretado pelos túbulos renais, não ser tóxico e não levar à alteração da TFG (HALLER et al., 1998; VON HENDY-WILLSON; PRESSLER, 2011)

Além disso, um bom biomarcador deve ser sensível, permitindo o diagnóstico precoce da doença renal, e específico; promover inovações das informações obtidas pelos testes já existentes (como identificar a gravidade da doença, permitir seu monitoramento, estimar prognóstico); ser acessível (não invasivo, baixo custo, fácil realização e interpretação); e principalmente trazer benefícios ao manejo do paciente (FRANGOIANNIS, 2012; COBRIN et al., 2013).

Atualmente a substância mais utilizada como biomarcador indireto de TFG é a creatinina sérica, entretanto sabe-se que sua interpretação deve ser cuidadosa. A creatinina aparece distribuída na água corporal, sua eliminação é principalmente renal e é filtrada livremente pelos glomérulos, não ocorre reabsorção a nível tubular, porém há pequena secreção pelos túbulos renais (principalmente em machos) (LEFEBVRE, 2011; COBRIN et al., 2013).

Por outro lado, sua concentração sérica pode sofrer a interferência de variáveis como massa muscular, raças (maiores valores em Greyhounds), ingestão alimentar (coleta deve ser realizada em animais em jejum), idade (aumento progressivo das concentrações séricas da fase juvenil para adulta), estado de hidratação e atividade física (HEIENE; MOE, 1998; BRAUN; LEFEBVRE; WATSON, 2003; VON HENDY-WILLSON; PRESSLER, 2011; LEFEBVRE, 2011). Além disso, a creatinina apresenta uma relação não-linear com a TFG (Figura 1). Ou seja, no início da DRC grandes alterações da TFG são pouco detectadas pela sCr, enquanto que o contrário (grandes variações na sCr correspondem a pequenas alterações na TFG) também ocorre nos estágios terminais da DRC (BRAUN; LEFEBVRE; WATSON, 2003; COBRIN et al., 2013).

Figura 1 – Curva de relação entre a taxa de filtração glomerular (TFG) e a creatinina sérica.

Fonte: Adaptado de Chew et al. (2011).

Novos estudos estão sempre em desenvolvimento a fim de se encontrar um biomarcador endógeno que melhor represente as variações da TFG. O grande objetivo é um diagnóstico precoce da DRC em relação ao que se tem hoje com a determinação da sCr, o que se traduziria em melhores possibilidades terapêuticas e, portanto, menor progressão da doença (LEES, 2004; GRAUER, 2005).

A determinação da dimetilarginina simétrica (SDMA) foi inicialmente estudada na medicina humana por KAKIMOTO e AKAZAWA em 1970, que descreveram que as concentrações dos resíduos dimetilados de arginina (SDMA e dimetilarginina assimétrica – ADMA) na urina eram maiores do que a concentração da própria arginina, que ocorriam de modo constante, não sendo influenciadas por variações na dieta e ainda, que sua produção era endógena. Além disso, demonstraram que sua concentração sérica era muito baixa e que, portanto, não existiam evidências de que havia reabsorção tubular (KAKIMOTO; AKAZAWA, 1970).

Inicialmente, os estudos baseavam-se na avaliação da ADMA, devido ao seu papel na disfunção endotelial e regulação da pressão sanguínea. A ADMA é um inibidor da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), impedindo a formação do óxido nítrico e seu papel na função endotelial (vasodilatação, inibição da adesão de plaquetas e monócitos, entre outras) (BÖGER et al., 1998; LEIPER; VALLANCE, 1999; BÖGER, 2004).

Conforme o avanço desses estudos foi observado que a SDMA aumentava em maior magnitude que a ADMA em humanos com DRC. Foi demonstrado que o

aumento da ADMA na DRC ocorria pela falta da enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolase (DDAH), expressa nas células endoteliais dos glomérulos, vasos renais e células tubulares, sendo responsável pela degradação da ADMA à citrulina (FLISER, 2005; JEPSON et al., 2008). Já a SDMA era excretada pelos rins, sem sofrer metabolização, sendo que seu aumento na DRC ocorria por alterações apenas na TFG (FLECK et al., 2001; WAHBI et al., 2001; JEPSON et al., 2008).

Marescau et al. (1997) em seu estudo em pacientes humanos doentes renais, foi o primeiro a demonstrar boa correlação ($r = -0,916$, $P < 0,0001$) entre valores séricos de SDMA e a TFG medida pelo *clearance* de creatinina (MARESCAU et al., 1997).

Kielstein et al. (2006) realizou uma meta-análise de 18 estudos, que incluíam um total de 2136 pacientes humanos, com o objetivo de avaliar as correlações entre as mensurações de SDMA e avaliações da TFG seja através do *clearance* ou pela estimação com a sCr. Assim, o coeficiente de correlação (r) entre SDMA e o *clearance* de inulina foi 0,85 (intervalo de confiança (IC) 0,76–0,91, $P < 0,0001$), entre SDMA e outros métodos de avaliação de *clearance* foi 0,77 (IC 0,65–0,85, $p < 0,0001$) e entre SDMA e sCr, $r = 0,75$ (IC 0,46–0,89, $P < 0,0001$) (KIELSTEIN et al., 2006).

Na medicina veterinária, o primeiro estudo que avaliou a SDMA na DRC foi realizado em 69 gatos com graus variados de azotemia, tendo demonstrado forte correlação da SDMA com a sCr ($r = 0,741$, $P < 0,001$) (JEPSON et al., 2008).

Em cães, estão sendo realizados estudos que avaliam a SDMA como marcador de TFG, bem como sua aplicação na rotina clínica. A SDMA é produzida constantemente no núcleo das células, através da metilação dos resíduos de arginina das proteínas por ação de enzimas proteína arginina metiltransferases (PRMTs), sem sofrer influências de outras doenças. Sua liberação da célula ocorre após a proteólise, via transportador catiônico de aminoácidos (CAT), posteriormente sendo eliminada quase exclusivamente por filtração glomerular e sem reabsorção tubular (PEDERSEN et al., 2006; RELFORD; ROBERTSON; CLEMENTS, 2016; YERRAMILLI et al., 2016).

Estudos em cães demonstraram correlação positiva entre a concentração de creatinina e os níveis de SDMA (PEDERSEN et al., 2006; HALL et al., 2016b), sendo que em um estudo, a SDMA sérica aumentou em média 9,8 meses (2,2 – 27 meses) antes do aumento da sCr (HALL et al., 2016b).

Além disso, em cães saudáveis, as concentrações de SDMA não foram influenciadas por sexo, tipo de alimentação, idade ou massa muscular ($r = -0,12$; $P = 0,45$), em contraposição à avaliação de creatinina que foi afetada por idade ($r = -0,34$; $P = 0,03$) e massa muscular ($r = 0,54$; $P = 0,0003$), evidenciando assim a possibilidade da SDMA ser um biomarcador de TFG mais sensível do que a sCr por ser menos influenciado por fatores extrarrenais. Neste estudo por outro lado, SDMA e sCr apresentaram baixa correlação ($r = 0,32$; $P = 0,04$), diferente dos resultados encontrados em outros estudos que avaliaram cães com DRC (HALL et al., 2015).

Nabity et al. (2015) avaliaram a utilidade da SDMA para identificar diminuição da função renal comparada à sCr e à TFG, bem como a correlação desses parâmetros com idade, peso e escore de condição corporal (ECC) em cães jovens com nefropatia hereditária ligada ao cromossomo X, em comparação com cães saudáveis. Foi observada forte correlação com a TFG entre SDMA ($r = -0,95$) e sCr ($r = -0,98$), bem como entre ambos ($r = 0,95$), porém a SDMA aumentou quando a redução da TFG era $< 30\%$, contra alteração de creatinina quando TFG $< 50\%$. Neste estudo, SDMA não apresentou correlação com idade, peso ou ECC em cães saudáveis diferente da sCr que apresentou correlação moderada a alta. Um dos cães saudáveis apresentou aumento não persistente da concentração de SDMA, evidenciando a necessidade de medidas seriadas para diagnóstico (NABITY et al., 2015).

Em gatos, estudos mostraram aumento dos níveis de SDMA ($> 14 \mu\text{g/dL}$), em alguns casos, 17 meses antes da alteração de creatinina ($> 2,1 \text{ mg/dL}$), e o aumento dos níveis de creatinina sempre estava correlacionado com a SDMA (HALL et al, 2014a); maior correlação linear da TFG com a SDMA do que com a creatinina sérica; ausência de influência de massa muscular e gênero, mas apenas da idade (associada a redução da TFG ao longo do tempo) sobre os níveis de SDMA (HALL et al, 2014b). Outro estudo em gatos, por outro lado mostrou relação semelhante entre a diminuição da TFG e o aumento de SDMA e creatinina, embora este tenha sido realizado com menor número de animais (BRAFF et al., 2014).

Conforme mencionado anteriormente, com a modificação das recomendações da IRIS em 2015, ficou estabelecido que cães com aumento persistente de SDMA $> 14 \mu\text{g/dL}$ e creatinina $< 1,4 \text{ mg/dL}$, seriam classificados no estágio 1 da DRC; já cães no estágio 2 pela classificação com a sCr e baixo escore de condição corporal (ECC) apresentando SDMA $\geq 25 \mu\text{g/dL}$, bem como aqueles no

estágio 3 pela classificação da sCr, com baixo ECC e apresentando SDMA ≥ 45 $\mu\text{g/dL}$, poderiam estar em um estágio subestimado, devendo ser tratados como estágio 3 e estágio 4, respectivamente (IRIS, 2016) (Figura 2).

Figura 2 – Classificação em estágios da doença renal crônica (DRC) em cães, com base nas avaliações de creatinina sérica e SDMA sérica, conforme IRIS, 2016.

	Estágio 1 Sem azotemia	Estágio 2 Discreto	Estágio 3 Moderado	Estágio 4 Grave
Creatinina em mg/dL	<1,4	1,4–2,0	2,1–5,0	>5,0
Estágio baseado na creatinina estável	>14	>14	Aumento moderado	Aumento intenso
SDMA em $\mu\text{g/dL}$		≥ 25		
Considerar o subestadiamento com base na creatinina			≥ 45	

Fonte: Adaptado de IDEXX.

2.3 TERAPIA DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

A terapia atual da DRC em cães baseia-se na prevenção ou tratamento de eventos que refletem a diminuição da função renal, como manifestações gastrintestinais (náusea, inapetência, êmese, diarreia, hemorragias, úlceras orais, halitose), desidratação, hiperfosfatemia levando ao hiperparatireoidismo secundário renal e mineralização tecidual, acidose metabólica, anemia, proteinúria e hipertensão arterial (POLZIN, 2013; IRIS, 2016).

Devido à limitação ao manejo conservador, estudos, principalmente na medicina humana utilizando modelos experimentais, têm sido realizados a fim de se avaliar a possibilidade da terapia com uso de células-tronco. Esta tem como principais pilares a regeneração tecidual e/ou a minimização de inflamação que leva a autoperpetuação do dano renal (MOLLURA; HARE; RABB, 2003; BRODIE; HUMES, 2005; CHOI et al., 2009).

As células-tronco são células indiferenciadas, capazes de se diferenciar em células especializadas e funcionais e de formar uma cópia delas mesmas (autorregeneração) via divisão celular (MORRISON; SHAH; ANDERSON, 1997; MOLLURA; HARE; RABB, 2003). Conforme sua diferenciação são consideradas totipotentes (podendo gerar células dos três folhetos germinativos embrionários e tecidos extraembrionários), pluripotentes (geram apenas células dos três folhetos germinativos embrionários) e multipotentes (podem se diferenciar em mais de um tipo de tecido, como as células-tronco mesenquimais (CTMs)) (MOLLURA; HARE; RABB, 2003).

Podem ser ainda categorizadas em células embrionárias e células adultas nas quais se classificam as células-tronco mesenquimais. As células-tronco adultas podem ser obtidas de diferentes fontes, como tecido adiposo, medula óssea e entre elas, o cordão umbilical tem sido uma importante fonte, por ter acesso relativamente fácil, sem necessidade de procedimentos invasivos adicionais (muitas vezes descartado no pós parto), quando comparado com outras fontes como medula óssea; além disso, possui baixo risco de contaminação, é rico em CTMs e não ameaça a questão ética relativa ao uso de células-tronco embrionárias (MOLLURA; HARE; RABB, 2003; PEIRED; SISTI; ROMAGNANI, 2016; QUIMBY, 2018).

As células do cordão umbilical podem ser obtidas do sangue ou até mesmo do estroma do cordão (geleia de Wharton), estas células embora já adultas são ainda bem jovens, com grande capacidade de diferenciação, apresentando boa alternativa para uso em terapia (BAKSH; SONG; TUAN, 2004; AZANDEH et al., 2012).

O potencial terapêutico das CTMs reside em suas características imunomoduladoras e seu potencial antifibrótico e pró-angiogênico. Sua ação no sistema imune consiste em reduzir o estímulo de proliferação aos linfócitos T, alterar perfis celulares de liberação de citocinas inflamatórias, diminuir diferenciação de células dendríticas e inibir a proliferação de linfócitos B. (REINDERS; FIBBE; RABELINK, 2010; WANG et al., 2014). Seu efeito parácrino, modula o microambiente da inflamação, alterando a expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, resultando na diminuição da apoptose, redução da inflamação, inibindo assim a fibrose tecidual, levando a promoção de angiogênese, estimulando mitose e diferenciação celular (MAZHARI; HARE, 2007; SEMEDO et al., 2009; REINDERS; FIBBE; RABELINK, 2010; PEIRED; SISTI; ROMAGNANI, 2016).

Assim, na doença renal, a redução da inflamação permite a regeneração vascular, previne a perda celular por ativação de mecanismos anti-apoptóticos e reduz a fibrose renal, fatores que associados levam à estabilização da função renal, como demonstrado nos estudos que empregam essa terapia (CAVAGLIERI et al., 2009; CAPCHA, 2015; CÓNDOR et al., 2016; LEE et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017).

Embora os efeitos parácrinos e imunomoduladores das células-tronco sejam já melhor identificados, a diferenciação celular ainda tem seu reconhecimento limitado, principalmente pela falta de recursos de imagem capazes de demonstrar tais alterações (TORRES CRIGNA et al., 2018). Estudos que apontam a diferenciação em células renais ainda são escassos, porém um estudo demonstrou a diferenciação de células-tronco mesenquimais da medula óssea, em células mesangiais renais (IMASAWA et al., 2001).

Estudos em ratos como modelo experimental de DRC (por excisão de 5/6 do parênquima renal) em que foi realizada a terapia com células-tronco mesenquimais, evidenciou-se menor progressão da doença renal, sendo isto associado à redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (SEMEDO et al., 2009; CAVAGLIERI et al., 2009).

A aplicação das CTMs por via intravenosa periférica fundamenta-se em sua propriedade de expressar receptores de quimiocinas como fator de agregação plaquetária, CD44 e ácido hialurônico, liberados pelo tecido em que há inflamação, que então recrutam essas células para este local. Esse processo é chamado de *homing* (SEMEDO et al., 2009; REINDERS; FIBBE; RABELINK, 2010; PEIRED; SISTI; ROMAGNANI, 2016).

Estudos com aplicação sistêmica de CTM de cordão umbilical humano em cães e camundongos demonstrou segurança de seu uso, bem como potencial terapêutico relacionado à imunomodulação e efeitos parácrinos (ZUCCONI et al., 2011; VIEIRA et al., 2012; CÓNDOR et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar sequencialmente cães com doença renal crônica, distribuídos conforme o estágio 2 ou 3 em dois grupos e conforme a terapia instituída (terapia conservadora ou terapia celular associada à conservadora), dessa forma comparou os efeitos destas terapias na progressão da doença renal crônica, já que ambas seriam indicadas no sentido de evitar a evolução da doença.

O objetivo específico deste estudo foi avaliar as concentrações de dimetilarginina simétrica sérica (SDMA) ao longo da evolução da doença e, portanto, da taxa de filtração glomerular, quando do uso da terapia de manutenção conservadora e/ou de terapia celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de mestrado foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ USP) protocolado sob o CEUA nº 8105020217 e esteve vinculado ao Projeto Temático da FAPESP (Processo número 2010/19012-0), aprovado na Comissão de Ética para Uso de Animais da FMVZ USP (Protocolo nº 2010/1914), como também na Comissão de Ética do Hospital Universitário da USP (Registro CEP – HU/USP: 1278/13; Plataforma Brasil: 15361613.8.0000.0076) e do CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM USP) (Protocolo nº 0003/11).

3.1 GRUPO DE ESTUDO

Foram avaliados 27 cães, provenientes do atendimento do Serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais do Departamento de Clínica Médica / Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo (VCM/HOVET USP), apresentando DRC estágios 2 ou 3 (segundo classificação da IRIS).

Como critérios de inclusão dos cães no estudo foram adotados a presença de azotemia renal persistente por no mínimo duas mensurações, em intervalos de no mínimo 15 dias, em animais hidratados e em jejum de 12 horas, sendo, portanto, excluída a azotemia pré-renal, bem com causas de azotemia pós-renal, além da presença de isostenúria/hipostenúria e/ou de alterações de morfologia renal ao exame ultrassonográfico.

Como critérios de exclusão foram considerados a presença de comorbidades como endocrinopatias, hepatopatias, doenças neurológicas, doenças infecciosas (erliquiose, leishmaniose, leptospirose), insuficiência cardíaca congestiva, neoplasias, piodermites e cães tratados anteriormente com células-tronco.

Para certificação de que os animais a serem incluídos no estudo respeitavam esses critérios, foram realizados anamnese e exame físico, levando em consideração o histórico clínico do animal, exames laboratoriais como hemograma, bioquímica sérica (fosfatase alcalina (FA), alanino aminotransferase (ALT), albumina,

proteína total, ureia, creatinina, cálcio, fósforo, triglicérides, colesterol), hemogasometria e eletrólitos (sódio, potássio, cloreto e cálcio iônico), exame de urina e urocultura, ultrassonografia abdominal e pressão arterial sistólica.

Após exclusão de comorbidades e estadiamento dos animais, estes foram distribuídos em dois grupos conforme segue.

3.1.1 Grupo A

Composto por 12 cães classificados no estágio 2 da DRC ($1,4 \leq \text{sCr} \leq 2,0$ mg/dL), com marcadores de lesão renal e apresentando ou não sinais clínicos.

Estes foram subdivididos em dois grupos conforme o tipo de intervenção realizada no estudo, (1) grupo de estudo ($n = 6$ cães), quando submetidos à terapia com células-tronco mesenquimais associada à terapia de manutenção conservadora (Grupo A – CTM) e (2) grupo controle ($n = 6$), quando submetidos apenas à terapia conservadora, denominada neste estudo como SF, em referência à administração de solução fisiológica como placebo no momento da aplicação das CTMs (Grupo A – SF).

3.1.2 Grupo B

Formado por 15 cães DRC estágio 3 ($2,1 \leq \text{sCr} \leq 5,0$ mg/dL), com marcadores de lesão renal e sinais clínicos associados ao estágio da DRC, como poliúria, polidipsia, entre outros.

Estes também foram subdivididos em grupo de estudo (B – CTM, $n = 8$ cães) e grupo controle (B – SF, $n = 7$ cães).

3.1.3 Grupo C

Composto por 12 cães saudáveis, avaliados pontualmente, que foram submetidos a exames de hemograma e de bioquímica (FA, ALT, albumina, proteína total, ureia, creatinina, cálcio, fósforo, triglicérides, colesterol), hemogasometria e eletrólitos (sódio, potássio, cloreto e cálcio iônico), exame de urina e urocultura,

ultrassonografia abdominal e pressão arterial sistólica, para exclusão de quaisquer afecções, bem como doença renal crônica.

Foi também armazenado soro desses animais a -80°C para posterior avaliação da SDMA sérica.

3.1.4 Acompanhamento

Os animais foram acompanhados no intervalo de 30 (± 15) dias, pelo período mínimo de 12 meses ou até o óbito. Alguns animais apresentaram intervalos de avaliação maiores (± 15 meses), por motivos de impossibilidade de alguns tutores em comparecer nas datas agendadas.

Os tempos de acompanhamento foram denominados tempo zero (T0), que corresponde ao início do estudo, marcado pelo dia da aplicação da terapia com células-tronco mesenquimais ou solução fisiológica (placebo). Os tempos seguintes foram denominados de T1 a T12, representando T1 o mês que se seguiu à intervenção e consequentemente T12, o tempo final do acompanhamento.

Todos os animais receberam terapia conservadora ou de manutenção, conforme as necessidades individuais e estágio da DRC em que foram classificados, baseando-se em correção do desequilíbrio hidreletrolítico e ácido-básico, controle da pressão arterial sistêmica, dieta hipoprotéica (mas composta de proteína de alto valor biológico) e hipofosfórica, uso de quelantes intestinais de fósforo quando detectada hiperfosfatemia e tratamento de afecções concomitantes que pudessem contribuir para a progressão da DRC.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta, processamento e armazenamento de material biológico

Os cães foram atendidos no período matutino e em jejum alimentar de 12 horas, a fim de se evitar interferências do ritmo circadiano, bem como de lipemia. Foram coletados 10 ml de sangue venoso através de punção das veias jugulares externas, cefálicas ou safenas sendo o volume total distribuído da seguinte forma: 2 ml em tubo com EDTA para realização de hemograma e separação de plasma, 7 ml

em tubo com gel ativador de coagulação para separação do soro e 1 ml em seringa com heparina de lítio para hemogasometria.

Após realização do hemograma, foi realizada centrifugação refrigerada para separação e armazenamento de plasma sanguíneo. Foi realizada também centrifugação refrigerada do sangue total para separação do soro, sendo que uma alíquota foi encaminhada ao Laboratório Clínico do HOVET USP para realização dos exames bioquímicos, e outra separada em eppendorfs, sendo estes armazenados a -80°C para realização posterior da dosagem de SDMA.

Foram coletadas amostras de 10 ml de urina por cistocentese ou cateterismo uretral (no caso de machos), para realização de exame de urina (até 12 horas após processamento) e urocultura (até 30 minutos em temperatura ambiente ou 12 horas, se refrigerada).

3.2.2 Exames Laboratoriais

As determinações das concentrações séricas de ureia e creatinina foram realizadas por meio das técnicas empregadas rotineiramente no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/ HOVET – FMVZ USP. Foram utilizados os seguintes kits comerciais Creatinina K - Labtest REF 96-300 e Urea/BUN-UV – Biosystems REF 11541, validados para o equipamento Labmax - 240 (Labtest Diagnostica SA).

A mensuração de SDMA sérica foi realizada a cada três meses $\pm$ 20 dias, como em nem todos os animais foi possível coincidir as avaliações de SDMA com os tempos T0, T3, T6, T9 e T12, para a avaliação de SDMA foi então designado o termo “momento” (M1, M2, M3, M4 e M5). As amostras de soro ficaram armazenadas em freezer -80°C pelo período máximo de 4 anos e ao final do período foram encaminhadas para laboratório comercial para execução do teste IDEXX SDMA™ no aparelho Catalyst One®. Embora não existam estudos que comprovem a estabilidade a longo prazo da SDMA mantida sob congelamento, existem evidências que demonstram que esta permanece estável por pelo menos 5 anos quando as amostras são armazenadas a -80°C (HOKAMP; NABITY, 2016). Este teste é um imunoenensaio, que utiliza a glicose 6-fosfato desidrogenase conjugada a

um anticorpo monoclonal anti-SDMA. O intervalo de referência estabelecido como normal é $\leq 14 \mu\text{g/dL}$ (RELFORD; ROBERTSON; CLEMENTS, 2016).

Os demais exames bioquímicos realizados para acompanhamento e monitorização dos pacientes também foram realizados no equipamento Labmax 240, com seus respectivos kits comerciais validados, no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/ HOVET – FMVZ USP. A hemogasometria venosa, bem como dosagem de eletrólitos foram executadas no equipamento Cobas B 221 (Roche®), com mensuração em intervalo de até 10 minutos após a coleta.

Foi realizado o exame físico-químico e do sedimento urinários, bem como urocultura das amostras, conforme as técnicas empregadas rotineiramente no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/ HOVET - FMVZ USP.

3.2.3 Outros Exames

3.2.3.1 Ultrassonografia abdominal

Realizada avaliação do parênquima renal por meio do exame de ultrassonografia abdominal, a cada seis meses (T0, T6 e T12). Sendo esta avaliação feita em todos os tempos e animais por um mesmo docente da área de diagnóstico por imagem do Departamento de Cirurgia da FMVZ USP.

3.2.3.2 Pressão Arterial Sistólica (PAS)

Avaliada no momento do acompanhamento mensal dos animais, com uso do método indireto com *Doppler* (Modelo 811-B Doppler Ultrasonic Flow Detector, Parks Medical Eletronics, Inc – Oregon, EUA).

As mensurações foram tiradas no membro torácico (direito ou esquerdo), utilizando-se manguitos conforme o tamanho do animal (40% da circunferência medida em centímetros no terço proximal do rádio e ulna).

Os animais ficavam acondicionados em ambientes separados de outros animais, com a presença do tutor por 10 minutos antes da mensuração, para tranquilização. Eram posicionados em decúbito lateral ou esternal, bem como em estação, mas respeitando a altura do membro próxima à base cardíaca.

Foram realizadas sete mensurações em cada animal (com descarte da primeira), e o valor final foi obtido pela média das mensurações. Os animais eram então classificados conforme subestadiamento proposto pela IRIS, descrito anteriormente. Sendo que o animal era considerado hipertenso quando PAS se mantinha elevada em mensurações realizadas em pelo menos dois momentos distintos, com intervalo de 15 dias, ou na presença de lesões em órgão-alvo (BROWN et al., 2007; IRIS, 2015).

3.2.3.3 Escore de Condição Corporal (ECC) e Escore de Massa Muscular (EMM)

Foi realizada a avaliação do escore de condição corporal (ECC) conforme escala de 1-9 de acordo com as recomendações de avaliação nutricional da American Animal Hospital Association (AAHA), sendo ECC 1/9 (caquexia): representado por cães que apresentavam extremidades ósseas aparentes, ausência de gordura corporal e perda de massa muscular, ECC 4-5/9 (ideal): cães com condição corporal ideal, sem excesso de camada de gordura e costelas facilmente palpáveis e ECC 9/9 (obesidade): aqueles cães com excessivo depósito de gordura e distensão abdominal evidente (BALDWIN et al., 2010).

Ainda foi avaliado o escore de massa muscular (EMM) pela escala de 0-3, sendo EMM 0/3 representado por acentuada perda de massa muscular e EMM 3/3 correspondente a massa muscular adequada (BALDWIN et al., 2010). Essas avaliações foram realizadas em todos os períodos de acompanhamento mensal dos cães.

3.2.4 Terapia com Células-Tronco Mesenquimais

Os animais foram randomizados e alocados quanto aos subgrupos, SF e CTM, pela equipe da Faculdade de Medicina da USP (FM-USP), também responsável pelo cultivo e purificação das células-tronco. A equipe veterinária da FMVZ-USP e os tutores dos cães não eram informados quanto à terapia que seria aplicada, permanecendo assim até o final do período de acompanhamento. Este foi um estudo clínico longitudinal prospectivo duplo-cego randomizado.

3.2.4.1 Separação de Células-tronco Mesenquimais

O processo de obtenção das células-tronco mesenquimais foi realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Nefrologia da Faculdade de Medicina da USP (FM – USP), sob a coordenação da Profa. Dra. Lúcia da Conceição Andrade. As células-tronco mesenquimais (CTM) foram obtidas de cordão umbilical humano, no pós-parto no Hospital Universitário (HU – USP), após consentimento esclarecido e assinatura do termo.

Após a coleta do cordão, este foi transportado de forma refrigerada (4°C) em meio contendo antibiótico e PBS (*Phosphate Buffer Solution*). As células-tronco mesenquimais foram extraídas da geleia de Wharton do cordão umbilical. O processamento do cordão ocorreu de forma estéril, utilizando-se cabine de biossegurança tipo II e seguindo as etapas de lavagem com PBS, corte do cordão em fragmentos de $\pm 0,5 \text{ cm}^2$, plaqueamento dos fragmentos, sendo então acrescentados meio de cultura α -MEM, suplemento de soro fetal bovino 20%, penicilina 100U/mL e estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), seguiu-se então a incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 (ThermoForma, Estados Unidos).

Os *explants* ficaram armazenados durante 15 a 25 dias, a troca do meio de cultura ocorreu em cerca de 2 a 3 vezes por semana. Os *explants* foram retirados após observada confluência das células em 80%, as placas foram então tripsinizadas (Gibco, Estados Unidos), e assim seguiu-se a expansão da cultura na primeira passagem em garrafas de 25 cm^2 e nas passagens seguintes em garrafas de 75 cm^2 .

O meio de cultura foi trocado a cada três dias durante o período de incubação. Quando as células apresentaram confluência entre 80-90%, as garrafas foram tripsinizadas e as células então expandidas em cultura até a 4ª passagem (P4), sendo congeladas em nitrogênio líquido posteriormente.

3.2.4.2 Diferenciação celular

A caracterização funcional das células-tronco mesenquimais foi realizada com a aplicação dos testes de plasticidade, como a diferenciação adipogênica,

osteogênica e condrogênica. Células de segunda passagem foram cultivadas em placas de 6 poços (1×10^5 células/poço), juntamente com meios de cultura que induzem adipogênese, osteogênese e condrogênese (2 poços por tipo de diferenciação), e gentamicina (10mg/mL).

Para diferenciação adipogênica foi usado meio basal de diferenciação de adipócitos STEMPRO® com suplemento para adipogênese STEMPRO® (Life Technologies, Waltham, EUA). A diferenciação condrogênica utilizou meio basal de diferenciação de condrócitos STEMPRO® com suplemento para condrogênese STEMPRO® (Life Technologies, Waltham, EUA). Para osteogênese foi usado meio basal de diferenciação de osteócitos STEMPRO® com suplemento para osteogênese STEMPRO® (Life Technologies, Waltham, EUA).

Estes meios eram trocados de duas a três vezes na semana, sendo mantidos em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, por 14 dias para indução condrogênica e adipogênica e por 21 dias para osteogênese.

A avaliação da adipogênese foi examinada após coloração de Oil Red, através de microscopia e exames citológicos, com visualização de vacúolos lipídicos no citoplasma das células. A diferenciação osteogênica foi analisada por microscopia, com coloração vermelho de alizarina, para visualização de células com depósitos de sais de cálcio. E a diferenciação condrogênica foi evidenciada com a coloração Alcian blue e visualização de polissacarídeos sulfatados.

3.2.4.3 Aplicação das células-tronco mesenquimais

Após o descongelamento rápido, em banho-maria à 37°C, com centrifugação e ressuspensão do pellet celular em soro fisiológico, foi realizada recontagem e diluição para que 1×10^6 células/kg fossem injetadas nos cães selecionados resultando em um volume final de solução fisiológica de 2 ml/kg.

A solução final foi colocada em bolsa de transfusão sanguínea, sendo esta envolvida por papel alumínio e identificada com o nome do animal, a fim de que não fosse possível a visualização do conteúdo, devido à turbidez da solução contendo células-tronco. Foi realizada infusão lenta periférica da solução na veia cefálica, no tempo T0 do estudo.

3.2.5 Análise estatística

Os cães dos grupos A e B, e respectivos subgrupos, foram avaliados individualmente ao longo da evolução da doença pelo período de acompanhamento sequencial. Para isso foi realizada a estatística descritiva, sendo calculado a média, mediana, desvio-padrão da média, erro padrão da média, valores mínimo e máximo e os percentis (25 e 75%) para os respectivos tempos.

A comparação entre os Grupos A - CTM X A - SF e os Grupos B - CTM x B - SF foi feita obtendo-se as médias dos tempos avaliados em cada grupo, bem como os deltas de cada animal, calculado da seguinte maneira: $\Delta = (T_{\text{final}} - T_0) / T_0$. Foi avaliada a distribuição desses resultados se paramétrica ou não-paramétrica pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando paramétrica, foi realizado o Teste t não pareado e quando não paramétrica o teste de Mann Whitney. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$.

Foi realizada a avaliação do coeficiente de correlação entre creatinina sérica e SDMA sérica, pelo método de Spearman, devido à distribuição dos dados ser não paramétrica.

As curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) foram realizadas em relação às faixas de SDMA estabelecidas para classificação da DRC (SDMA ≤ 14 $\mu\text{g/dL}$; SDMA: 15 – 24 $\mu\text{g/dL}$; SDMA: 25 – 44 $\mu\text{g/dL}$ e SDMA ≥ 45 $\mu\text{g/dL}$), em relação à razão SDMA/sCr, descrita em literatura que valores da SDMA/sCr > 10 são indicadores de pior prognóstico em cães e gatos (YERRAMILLI et. al., 2015) e em relação à terapia instituída. Para comparação das curvas foi aplicado o teste de Log-rank.

Todas as análises realizadas usando o GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

5 RESULTADOS

5.1 GRUPO C (CONTROLE)

O grupo controle foi composto por 12 cães clinicamente saudáveis, avaliados em um único momento. A idade média ($\pm$ DP) dos cães foi de 5,6 ($\pm$ 4) anos, quanto à definição racial, 50% eram sem raça definida (SRD), sendo que os demais se distribuíram da seguinte forma: Bulldogue americano (25%), Pinscher (16,7%) e Boxer (8,3%). Em relação ao sexo, 58,3% eram fêmeas, enquanto 41,7% eram machos. O Quadro 1 apresenta o resumo desses dados.

Quadro 1 - Identificação dos cães clinicamente saudáveis do grupo controle (GRUPO C) de C1 a C12, de acordo com idade (anos), definição racial e sexo, atendidos no HOVET – USP. São Paulo, 2019.

Cão	Idade (anos)	Raça	Sexo
C1	1	Bulldogue Americano	Fêmea
C2	7,7	SRD	Fêmea
C3	11,7	SRD	Fêmea
C4	3,4	Pinscher	Macho
C5	2,2	Bulldogue Americano	Macho
C6	2	Bulldogue Americano	Macho
C7	6	SRD	Macho
C8	3,4	Pinscher	Fêmea
C9	11,3	Boxer	Fêmea
C10	2,2	SRD	Fêmea
C11	11,7	SRD	Fêmea
C12	4,8	SRD	Macho

Legenda: SRD – sem raça definida. C1 – C12: cães clinicamente saudáveis, pertencentes ao Grupo Controle.

Os cães pertencentes ao grupo controle apresentaram concentrações séricas médias ($\pm$ DP) de SDMA de 9 ($\pm$ 2,6) μ g/dL, sCr de 1,0 ($\pm$ 0,2) mg/dL e ureia de 47,3 ($\pm$ 12,7) mg/dL. Com base nesses valores, bem como nos demais parâmetros avaliados (histórico, exame físico, urinálise, ultrassonografia abdominal), esses cães foram inseridos no grupo controle. Segue Tabela 1 com os valores individuais de cada animal, bem como estatística descritiva dos dados.

Tabela 1 - Valores individuais da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$), creatinina (sCr) (mg/dL) e ureia (mg/dL), dos animais do Grupo C; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

Cães	SDMA ($\mu\text{g/dL}$)	sCr (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
C1	13,0	1,00	73,7
C2	9,0	1,00	52,7
C3	12,0	1,0	34,6
C4	8,0	0,84	44,0
C5	6,0	1,18	50,5
C6	8,0	1,10	41,0
C7	6,0	0,85	68,6
C8	5,0	0,89	36,5
C9	10,0	1,40	50,8
C10	7,0	1,00	39,8
C11	10,0	0,94	35,0
C12	12,0	1,1	40,9
Média	9	1,0	47,3
Mediana	8,5	1,0	42,5
DP	2,6	0,2	12,7
CV	30%	15%	27%
EPM	0,76	0,05	3,67
Mínimo	5	0,84	34,6
Máximo	13	1,4	73,7
Perc. 25%	6,8	0,9	39,0
Perc. 75%	10,5	1,1	51,3

5.2 GRUPO A (CÃES NO ESTÁGIO 2 DA DRC)

Os cães do grupo A ($n = 12$), tiveram idade média ($\pm$ DP) de 9 ($\pm 5,2$) anos, entretanto no subgrupo A – SF a média de idade (média; mínimo-máximo) foi menor (7,3; 2 – 15 anos) quando comparada ao subgrupo A – CTM (10,6; 5,4 – 16 anos). Houve a mesma proporção entre machos e fêmeas no grupo ($n = 6$, cada sexo), bem como nos dois subgrupos (SF e CTM) ($n = 3$ machos e $n = 3$ fêmeas, em cada subgrupo). O padrão racial foi misto, representado por 25% ($n = 3$) de cães sem raça definida (SRD), porcentagem igual de 16% ($n = 2$) das raças Pug e Poodle, e os demais representados por um cão de cada raça (Bulldogue Americano, Golden

Retriever, Labrador Retriever, Lhasa Apso e Shih Tzu). O resumo dessas características encontra-se no Quadro 2.

Nenhum dos animais veio a óbito no período estabelecido, sendo acompanhados até T12 (tempo final), com exceção do animal A9 que foi acompanhado apenas até T10 por motivo de abandono do estudo. Alguns animais apresentaram durante o acompanhamento algumas intercorrências associadas à disfunção renal, que foram tratadas conforme terapia usual (Quadro 3).

As avaliações individuais do escore de massa muscular (EMM) e do escore de condição corporal (ECC) encontram-se, respectivamente, nos Quadros 4 e 5.

Quadro 2 - Identificação dos cães com doença renal crônica do GRUPO A (estágio 2) de A1 a A12, divididos conforme os subgrupos em A – SF (animais que receberam aplicação de solução fisiológica) e A – CTM (cães que receberam a aplicação de células-tronco mesenquimais), de acordo com idade (anos), peso (kg), definição racial, sexo e ocorrência de óbito no período de estudo, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, 2019.

Grupo	Cão	Idade (anos)	Peso (kg)	Raça	Sexo	Óbito no estudo?
A - SF	A1	2	28,7	Bulldogue americano	Fêmea	Não
	A2	10	8,8	Pug	Macho	Não
	A3	3	33,6	Golden Retriever	Fêmea	Não
	A4	12	42,0	Labrador Retriever	Macho	Não
	A5	2,1	11,6	SRD	Fêmea	Não
	A6	15	6,6	Lhasa Apso	Macho	Não
A - CTM	A7	16	3,2	Poodle	Fêmea	Não
	A8	14	4,2	Poodle	Macho	Não
	A9	6,3	5,0	Shih Tzu	Fêmea	Não
	A10	8,3	26,2	SRD	Macho	Não
	A11	13,8	11	Pug	Macho	Não
	A12	5,4	7	SRD	Fêmea	Não

Legenda: SRD – sem raça definida.

Quadro 3 - Eventos secundários à disfunção renal que ocorreram em alguns cães do Grupo A (A – SF e A – CTM), durante o período de T0 a T12, bem como terapia preconizada. São Paulo, 2019.

Grupo A - SF	Evento	Tempo	Tratamento
A1	Acidose metabólica	Antes de T0	BIC - VO
A6	Acidose metabólica	Antes de T0	BIC - VO
Grupo A - CTM	Evento	Tempo	Tratamento
A8	Acidose metabólica	T7	BIC - VO
A10	Pielonefrite	T6	Enrofloxacino - VO
A11	ITU	T2	Enrofloxacino - VO

Legenda: A: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 2 (IRIS); SF: grupo que recebeu solução fisiológica; CTM: grupo que recebeu célula-tronco mesenquimal; BIC: bicarbonato de sódio; VO: via oral; ITU: infecção do trato urinário.

Quadro 4 - Escore de massa muscular (EMM: 0 - 3) dos cães do Grupo A (A1 a A12), classificados em sub-grupos A-SF e A-CTM, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, 2019.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
A1 SF	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
A2 SF	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
A3 SF	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
A4 SF	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
A5 SF	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
A6 SF	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
A7 CTM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A8 CTM	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
A9 CTM	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2*		
A10 CTM	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
A11 CTM	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
A12 CTM	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Legenda: A: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 2 (IRIS); SF: grupo que recebeu solução fisiológica; CTM: grupo que recebeu célula-tronco mesenquimal; *: animal acompanhado até T10.

Quadro 5 - Escore de condição corpórea (ECC: 1 - 9) dos cães do Grupo A (A1 a A12), classificados em sub-grupos A-SF e A-CTM, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, 2019.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
A1 SF	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
A2 SF	7	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8
A3 SF	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
A4 SF	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
A5 SF	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
A6 SF	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
A7 CTM	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
A8 CTM	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
A9 CTM	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6*		
A10 CTM	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	5	5	5
A11 CTM	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	7
A12 CTM	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Legenda: A: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 2 (IRIS); SF: grupo que recebeu solução fisiológica; CTM: grupo que recebeu célula-tronco mesenquimal; *: animal acompanhado até T10.

O EMM dos cães do grupo A variou em sua maioria entre 2/3 e 3/3, apenas o cão A7 apresentou EMM 1/3, devido à sarcopenia associada à idade (16 anos). Além disso, todos os cães mantiveram relativamente constante sua condição muscular durante o período.

Em relação à avaliação do ECC, quatro animais estavam no escore ideal (ECC: 5/9) (A5, A7, A10 e A12), seis se encontravam na faixa de escore que caracteriza sobrepeso (ECC: 6 e 7/9) (A1, A2, A4, A6, A8 e A9), sendo que o cão A2 evoluiu para obesidade (ECC: 8/9) no tempo T7. Dois cães (A3 e A11)

apresentavam obesidade (ECC: 9/9) desde o início do acompanhamento, porém o cão A11 em T11 iniciou programa de emagrecimento, evoluindo ao final do estudo para ECC: 7/9.

Os resultados obtidos na avaliação mensal dos cães para creatinina sérica (sCr) e ureia sérica (sU) foram dispostos nas tabelas 2, 3, 4 e 5, bem como sua avaliação descritiva (média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV), valores mínimo e máximo, percentis 25% e 75%). A SDMA foi avaliada em intervalos (determinados “momentos”) de aproximadamente três meses, sendo, portanto, avaliados cinco momentos (M1 a M5). Os resultados foram organizados nas tabelas 6 e 7, associados às concentrações de sCr e sU correspondentes ao momento avaliado, bem como apresentada a estatística descritiva dos dados.

Tabela 2 - Valores individuais da concentração sérica de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo A - SF, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

Grupo A - SF	A1	A2	A3	A4	A5	A6
sCr T0	1,7	1,6	2,0	1,6	1,5	1,5
sCr T1	1,9	1,7	1,9	1,6	1,5	1,4
sCr T2	1,9	1,4	2,1	1,5	1,7	1,5
sCr T3	1,8	1,5	1,9	1,5	1,5	1,2
sCr T4	1,8	1,9	1,8	2,0	1,4	1,3
sCr T5	1,8	1,2	2,1	1,9	1,4	1,4
sCr T6	1,9	1,6	1,9	2,0	1,5	1,5
sCr T7	2,4	1,4	1,8	1,8	1,4	1,5
sCr T8	2,1	1,5	2,0	1,8	1,3	2,2
sCr T9	2,2	1,7	1,9	1,8	1,3	1,7
sCr T10	2,6	1,3	2,0	1,9	1,5	1,4
sCr T11	2,8	1,5	2,2	1,7	1,3	1,4
sCr T12	2,4	1,6	1,9	1,6	1,0	1,9
Média	2,1	1,5	2,0	1,7	1,4	1,5
Mediana	1,9	1,5	1,9	1,8	1,4	1,5
DP	0,35	0,18	0,12	0,18	0,17	0,27
CV (%)	16,72%	12,04%	6,08%	10,09%	11,77%	17,36%
EPM	0,10	0,05	0,03	0,05	0,05	0,07
Mínimo	1,7	1,2	1,8	1,5	1,0	1,2
Máximo	2,8	1,9	2,2	2,0	1,7	2,2
Perc. 25%	1,8	1,4	1,9	1,6	1,3	1,4
Perc. 75%	2,4	1,6	2,0	1,9	1,5	1,5

Tabela 3 - Valores individuais da concentração sérica de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo A - CTM, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

Grupo A - CTM	A7	A8	A9	A10	A11	A12
sCr T0	1,3	1,5	1,7	1,7	1,6	1,5
sCr T1	1,8	1,8	2,0	1,6	1,7	1,5
sCr T2	1,0	2,1	1,7	1,7	1,7	1,5
sCr T3	0,9	2,5	1,6	1,6	1,8	1,6
sCr T4	1,2	1,9	1,7	1,6	1,5	1,6
sCr T5	NR	2,3	1,9	1,6	1,6	1,9
sCr T6	1,0	2,1	1,9	1,7	1,6	2,3
sCr T7	1,1	1,9	1,9	1,9	1,6	1,6
sCr T8	1,1	1,9	1,9	1,8	1,5	1,4
sCr T9	1,2	1,9	1,9	1,8	1,4	1,3
sCr T10	1,2	1,6	1,9	1,7	1,4	1,5
sCr T11	1,1	1,8	*	1,7	1,6	1,5
sCr T12	1,0	1,8	*	1,7	1,6	1,8
Média	1,2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,6
Mediana	1,1	1,9	1,9	1,7	1,6	1,5
DP	0,23	0,27	0,13	0,09	0,11	0,24
CV (%)	19,98%	13,93%	6,96%	5,09%	7,03%	14,76%
EPM	0,07	0,07	0,04	0,02	0,03	0,07
Mínimo	0,9	1,5	1,6	1,6	1,4	1,3
Máximo	1,8	2,5	2,0	1,9	1,8	2,3
Perc. 25%	1,0	1,8	1,7	1,6	1,5	1,5
Perc. 75%	1,2	2,1	1,9	1,7	1,6	1,6

Tabela 4 - Valores individuais da concentração sérica de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo A - SF, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

Grupo A - SF	A1	A2	A3	A4	A5	A6
sU T0	54,5	39,8	68,5	68,5	57,8	62,4
sU T1	63,4	39,5	90,0	54,8	76,6	53,9
sU T2	70,0	32,7	67,2	66,8	77,8	58,8
sU T3	74,9	40,2	101,1	47,6	72,1	82,9
sU T4	52,3	33,2	57,4	54,7	69,4	71,0
sU T5	69,9	36,8	53,1	79,9	88,1	81,9
sU T6	96,3	43,6	54,4	75,4	58,1	82,8
sU T7	113,6	48,1	72,2	62,3	52,4	104,4
sU T8	88,5	45,2	62,0	56,2	70,0	194,0
sU T9	74,3	53,4	62,5	64,6	54,6	150,4
sU T10	75,0	38,0	61,3	72,6	66,3	108,8
sU T11	86,6	36,6	64,4	83,0	50,9	101,3
sU T12	74,8	43,4	61,8	56,8	60,9	137,4
Média	76,5	40,8	67,4	64,9	65,8	99,2
Mediana	74,8	39,8	62,5	64,6	66,3	82,9
DP	16,72	5,87	13,77	10,77	11,19	40,68
CV (%)	21,86%	14,39%	20,44%	16,61%	17,02%	41,00%
EPM	4,64	1,63	3,82	2,99	3,10	11,28
Mínimo	52,3	32,7	53,1	47,6	50,9	53,9
Máximo	113,6	53,4	101,1	83,0	88,1	194,0
Perc. 25%	69,9	36,8	61,3	56,2	57,8	71,0
Perc. 75%	86,6	43,6	68,5	72,6	72,1	108,8

Tabela 5 - Valores individuais da concentração sérica de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo A - CTM, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

Grupo A - CTM	A7	A8	A9	A10	A11	A12
sU T0	134,6	96,5	87,2	61,5	37,9	28,1
sU T1	104,4	115,4	120,6	52,1	36,1	24,4
sU T2	113,7	133,7	89,5	46,9	41,2	27,7
sU T3	68,8	140,5	83,8	53,0	41,3	32,5
sU T4	99,5	144,3	91,2	50,6	21,8	34,9
sU T5	NR	160,5	95,7	47,0	36,3	36,0
sU T6	64,7	116,0	101,9	49,8	32,7	49,4
sU T7	97,3	92,1	89,7	57,4	31,4	29,2
sU T8	75,6	107,4	99,7	57,8	33,4	27,9
sU T9	66,4	127,1	78,5	61,5	24,0	17,4
sU T10	77,0	110,0	78,5	54,5	29,3	20,4
sU T11	63,4	66,9	*	53,4	28,1	25,6
sU T12	73,0	84,4		40,2	46,9	40,0
Média	86,5	115,0	92,4	52,7	33,9	30,3
Mediana	76,3	115,4	89,7	53,0	33,4	28,1
DP	22,92	26,26	12,06	6,07	7,13	8,45
CV (%)	26,48%	22,84%	13,05%	11,51%	21,06%	27,92%
EPM	6,62	7,28	3,64	1,68	1,98	2,34
Mínimo	63,4	66,9	78,5	40,2	21,8	17,4
Máximo	134,6	160,5	120,6	61,5	46,9	49,4
Perc. 25%	68,2	96,5	85,5	49,8	29,3	25,6
Perc. 75%	100,7	133,7	97,7	57,4	37,9	34,9

Tabela 6 - Valores individuais da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$), creatinina (sCr) (mg/dL) e ureia (sU) (mg/dL), dos cães do Grupo A – SF, nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo (mín.) e máximo (máx.), e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

A - SF	A1			A2			A3			A4			A5			A6		
	SDMA	sCr	sU	SDMA	sCr	sU	SDMA	sCr	sU	SDMA	sCr	sU	SDMA	sCr	sU	SDMA	sCr	sU
M1	24	1,7	54,5	18	1,6	39,8	20	2,0	68,5	33	1,6	68,5	20	1,6	76,6	16	1,4	53,9
M2	22	1,8	74,9	23	1,5	40,2	15	1,9	101,1	32	1,5	66,8	21	1,5	72,1	17	1,3	82,9
M3	22	1,9	96,3	26	1,6	43,6	26	1,9	54,4	24	2,0	75,4	22	1,4	52,4	16	1,4	81,9
M4	25	2,2	74,3	23	1,3	38	19	2,0	62,0	24	1,8	64,6	29	1,3	54,6	24	1,7	150,4
M5	27	2,8	86,6	27	1,6	43,4	27	2,2	64,4	26	1,6	56,8	17	1,0	60,9	20	1,9	137,4
Média	24	2,08	77,32	23,4	1,52	41	21,4	2	70,08	27,8	1,7	66,42	22	1,4	63,3	19	1,5	101,3
Mediana	24	1,9	74,9	23	1,6	40,2	20	2	64,4	26	1,6	66,8	21	1,4	60,9	17	1,4	82,9
DP	2,12	0,44	15,67	3,51	0,13	2,43	5,03	0,12	18,08	4,38	0,20	6,73	4,44	0,23	10,66	3,44	0,25	40,85
CV (%)	8,84	21,34	20,27	14,99	8,58	5,92	23,50	6,12	25,81	15,76	11,76	10,13	20,36	16,93	16,84	18,47	16,30	40,33
EPM	0,95	0,20	7,01	1,57	0,06	1,09	2,25	0,05	8,09	1,96	0,09	3,01	1,98	0,10	4,77	1,54	0,11	18,27
Mínimo	22	1,7	54,5	18	1,3	38	15	1,9	54,4	24	1,5	56,8	17	1,0	52,4	16	1,3	53,9
Máximo	27	2,8	96,3	27	1,6	43,6	27	2,2	101,1	33	2	75,4	29	1,6	76,6	24	1,9	150,4
Perc. 25%	22	1,8	74,3	23	1,5	39,8	19	1,9	62	24	1,6	64,6	20	1,3	54,6	16	1,4	81,9
Perc. 75%	25	2,2	86,6	26	1,6	43,4	26	2	68,5	32	1,8	68,5	22	1,5	72,1	20	1,7	137,4

Tabela 7 - Valores individuais da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$), creatinina (sCr) (mg/dL) e ureia (sU) (mg/dL), dos cães do Grupo A – CTM, nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo (mín.) e máximo (máx.), e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

A - CTM	A7			A8			A9			A10			A11			A12		
	SDMA	sCr	sU	SDMA	sCr	sU	SDMA	sCr	sU	SDMA	sCr	sU	SDMA	sCr	sU	SDMA	sCr	sU
M1	15	1,3	134,6	19	1,5	115,4	19	1,7	87,2	12	1,73	61,5	26	1,59	37,9	21	1,53	28,1
M2	16	0,9	68,8	24	1,8	133,7	21	1,8	91,2	16	1,62	53,0	26	1,76	41,3	20	1,59	32,5
M3	15	1,0	64,7	29	1,9	116,0	26	1,9	101,9	15	1,67	49,8	27	1,61	32,7	27	2,25	49,4
M4	20	1,2	66,4	20	1,7	110	18	1,9	89,7	12	1,8	61,5	23	1,4	24,0	25	1,30	17,4
M5	19	1,1	73	28	1,9	127,1	32	1,9	78,5	16	1,7	40,2	18	1,6	46,9	33	1,80	40,0
Média	17	1,1	81,5	24	1,76	120,4	23,2	1,8	89,7	14	1,7	53,2	24	1,59	36,6	25	1,69	33,5
Mediana	16	1,1	68,8	24	1,8	116	21	1,9	89,7	15	1,7	53,0	26	1,60	37,9	25	1,59	32,5
DP	2,35	0,16	29,85	4,53	0,17	9,67	5,81	0,09	8,41	2,05	0,07	8,92	3,67	0,13	8,72	5,22	0,36	12,09
CV (%)	13,80	14,37	36,62	18,87	9,51	8,03	25,02	4,86	9,37	14,43	3,95	16,77	15,31	8,04	23,84	20,70	21,15	36,10
EPM	1,05	0,07	13,35	2,02	0,07	4,33	2,60	0,04	3,76	0,92	0,03	3,99	1,64	0,06	3,90	2,33	0,16	5,41
Mínimo	15	0,9	64,7	19	1,5	110	18	1,7	78,5	12	1,62	40,2	18	1,40	24,0	20	1,30	17,4
Máximo	20	1,3	134,6	29	1,9	133,7	32	1,9	101,9	16	1,80	61,5	27	1,76	46,9	33	2,25	49,4
Perc. 25%	15	1	66,4	20	1,7	115,4	19	1,8	87,2	12	1,67	49,8	23	1,59	32,7	21	1,53	28,1
Perc. 75%	19	1,2	73	28	1,9	127,1	26	1,9	91,2	16	1,73	61,5	26	1,61	41,3	27	1,80	40,0

As concentrações séricas médias de creatinina (sCr) dos cães no Grupo A – SF variaram entre 1,4 – 2,1 mg/dL (Tabela 2). O coeficiente de variação (CV) dos

valores foi de 6,08% no animal A3 a 17,36% no animal A6. As menores concentrações de sCr ficaram no intervalo de 1,0 (cão A5) a 1,8 (A3) (valores mínimos), enquanto as maiores foram de 1,7 (A5) a 2,8 (A1). Alguns cães (50%) apresentaram em pelo menos um tempo de avaliação valores de sCr menores que a referência para o estágio 2 da DRC, enquanto outros 33,3% apresentaram valores acima, portanto na faixa para o estágio 3.

O Grupo A – CTM apresentou médias das concentrações de sCr variando de 1,2 – 1,9 mg/dL (Tabela 3). A variação individual dos valores foi de 5,09% a 19,98%, correspondendo ao CV dos cães A10 e A7, respectivamente, sendo que o valor mínimo de sCr foi de 0,9 mg/dL (A7) e o máximo de 2,5 mg/dL (A8). Destes cães, a mesma porcentagem (33,3%) apresentavam valores de sCr ou abaixo ou acima do intervalo para o estágio 2 da DRC.

As médias $\pm$ DP das concentrações séricas de ureia (sU) nos cães do Grupo A – SF foram de $40,8 \pm 5,87$ (A2) – $99,2 \pm 40,68$ mg/dL (A6), o intervalo do coeficiente de variação individual foi de 14,39% (A2) a 41% (A6). Apenas o cão A2 apresentou em alguns tempos valores de sU dentro do limite de referência (20 – 40 mg/dL), sendo que os demais apresentaram valores mínimos variando de 47,6 (A4) a 53,9 mg/dL (A6) e valores máximos que se estenderam de 53,4 (A2) a 194 mg/dL (A6).

Em relação ao Grupo A – CTM, os valores médios $\pm$ DP das concentrações séricas de ureia foram de $30,3 \pm 8,45$ (A12) a $115 \pm 26,26$ mg/dL (A8). O coeficiente de variação individual esteve no intervalo de 11,51% (A10) a 27,92% (A12). Dois cães desse subgrupo apresentaram em alguns tempos valores de sU na faixa de referência, sendo eles o animal A11 (sU mínima = 21,8 mg/dL) e o animal A12 (sU mínima = 17,4 mg/dL). Os valores máximos variaram de 46,9 (A11) a 160,5 mg/dL (A8).

Na média ($\pm$ DP), as concentrações de SDMA no subgrupo SF variaram de $19 (\pm 3,44)$ a $28 (\pm 4,38)$ μ g/dL e no subgrupo CTM de $14 (\pm 2,05)$ a $25 (\pm 5,22)$ μ g/dL. No Grupo A – SF, o valor mínimo de SDMA foi de 15 μ g/dL (A3), portanto, discretamente acima do valor de referência para normalidade (14 μ g/dL), no entanto todos os animais tiveram em algum momento concentração de SDMA acima do limite estabelecido para o estágio 2 da DRC (até 24 μ g/dL), com exceção do cão A6 (valor máximo de SDMA = 24 μ g/dL).

No Grupo A – CTM, os valores mínimos de SDMA foram de 12 (A10) a 20 µg/dL (A12), portanto, alguns animais apresentavam valores na faixa de normalidade, enquanto os valores máximos foram de 29 (A8) a 33 µg/dL (A12), todos acima da referência para o estágio 2.

As variações entre SDMA e sCr podem ser melhor evidenciadas nas tabelas 8 e 9, que relacionam as faixas de SDMA, estabelecidas pela IRIS para reclassificação da DRC, com a concentração sérica de creatinina (sCr), bem como com o EMM. Assim, $SDMA \leq 14$ µg/dl caracteriza faixa de referência normal; $SDMA > 14$ µg/dl em animal com concentração de $sCr \leq 1,4$ mg/dL corresponderia à DRC estágio 1; já cães apresentando outros marcadores de lesão renal e SDMA entre 15 – 24 µg/dl classificariam como estágio 2; cães no estágio 2 pela sCr com SDMA de 25 – 44 µg/dl, deveriam ser considerados como estágio 3 e cães no estágio 3 pela sCr, com $SDMA \geq 45$ µg/dl, como estágio 4.

O quadro 6 resume as evoluções de estágio destes animais durante o estudo.

Tabela 8 - Valores das faixas de SDMA sérica correspondentes aos estágios da DRC (IRIS, 2016), dos cães do Grupo A – SF nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; relacionados com a concentração de creatinina sérica (sCr) e escore de massa muscular (EMM). São Paulo – 2019.

Grupo A - SF M1	Normalidade SDMA ≤ 14 µg/dl n = 0	Estágio 2 SDMA: 15-24 µg/dl n = 5	Estágio 3 SDMA: 25-44 µg/dl n = 1	Estágio 4 SDMA ≥ 45 µg/dl n = 0
sCr (mg/dL)	-	1,7 (A1); 1,6 (A2); 2,0 (A3); 1,6 (A5); 1,4 (A6)	1,6 (A4)	-
EMM (0 – 3)	-	3 (A1); 2 (A2); 2 (A3); 3 (A5); 2 (A6)	3 (A4)	-
Grupo A - SF M2	SDMA ≤ 14 µg/dl n = 0	SDMA: 15-24 µg/dl n = 5	SDMA: 25-44 µg/dl n = 1	SDMA ≥ 45 µg/dl n = 0
sCr (mg/dL)	-	1,8 (A1); 1,5 (A2); 1,9 (A3); 1,5 (A5); 1,3 (A6)	1,5 (A4)	-
EMM (0 – 3)	-	3 (A1); 2 (A2); 2 (A3); 3 (A5); 2 (A6)	3 (A4)	-
Grupo A - SF M3	SDMA ≤ 14 µg/dl n = 0	SDMA: 15-24 µg/dl n = 4	SDMA: 25-44 µg/dl n = 2	SDMA ≥ 45 µg/dl n = 0
sCr (mg/dL)	-	1,9 (A1); 2,0 (A4); 1,4 (A5); 1,4 (A6)	1,6 (A2); 1,9 (A3)	-
EMM (0 – 3)	-	3 (A1); 3 (A4); 3 (A5); 2 (A6)	2 (A2); 2 (A3)	-
Grupo A - SF M4	SDMA ≤ 14 µg/dl n = 0	SDMA: 15-24 µg/dl n = 4	SDMA: 25-44 µg/dl n = 2	SDMA ≥ 45 µg/dl n = 0
sCr (mg/dL)	-	1,3 (A2); 2,0 (A3); 1,8 (A4); 1,7 (A6)	2,2 (A1); 1,3 (A5)	-
EMM (0 – 3)	-	2 (A2); 2 (A3); 3 (A4); 2 (A6)	3 (A1); 3 (A5)	-
Grupo A - SF M5	SDMA ≤ 14 µg/dl n = 0	SDMA: 15-24 µg/dl n = 2	SDMA: 25-44 µg/dl n = 4	SDMA ≥ 45 µg/dl n = 0
sCr (mg/dL)	-	1,0 (A5); 1,9 (A6)	2,8 (A1); 1,6 (A2); 2,2 (A3); 1,6 (A4)	-
EMM (0 – 3)	-	3 (A5); 2 (A6)	3 (A1); 2 (A2); 2 (A3); 3 (A4)	-

Tabela 9 - Valores das faixas de SDMA sérica correspondentes aos estágios da DRC (IRIS, 2015), dos cães do Grupo A – CTM nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; relacionados com a concentração de creatinina sérica (sCr) e escore de massa muscular (EMM). São Paulo – 2019.

Grupo A - CTM M1	Normalidade SDMA ≤ 14 µg/dl n = 1	Estágio 2 SDMA: 15-24 µg/dl n = 4	Estágio 3 SDMA: 25-44 µg/dl n = 1	Estágio 4 SDMA ≥ 45 µg/dl n = 0
sCr (mg/dL)	1,73 (A10)	1,3 (A7) ; 1,5 (A8) ; 1,7 (A9) ; 1,53 (A12)	1,59 (A11)	-
EMM (0 – 3)	3 (A10)	1 (A7) ; 2 (A8) ; 2 (A9) ; 3 (A12)	2 (A11)	-
Grupo A - CTM M2	SDMA ≤ 14 µg/dl n = 0	SDMA: 15-24 µg/dl n = 5	SDMA: 25-44 µg/dl n = 1	SDMA ≥ 45 µg/dl n = 0
sCr (mg/dL)	-	0,9 (A7) ; 1,8 (A8) ; 1,8 (A9) ; 1,62 (A10) ; 1,59 (A12)	1,76 (A11)	-
EMM (0 – 3)	-	1 (A7) ; 2 (A8) ; 2 (A9) ; 3 (A10) ; 3 (A12)	2 (A11)	-
Grupo A - CTM M3	SDMA ≤ 14 µg/dl n = 0	SDMA: 15-24 µg/dl n = 2	SDMA: 25-44 µg/dl n = 4	SDMA ≥ 45 µg/dl n = 0
sCr (mg/dL)	-	1,0 (A7) ; 1,67 (A10)	1,9 (A8) ; 1,9 (A9) ; 1,61 (A11) ; 2,25 (A12)	-
EMM (0 – 3)	-	1 (A7) ; 3 (A10)	2 (A8) ; 2 (A9) ; 2 (A11) ; 3 (A12)	-
Grupo A - CTM M4	SDMA ≤ 14 µg/dl n = 1	SDMA: 15-24 µg/dl n = 4	SDMA: 25-44 µg/dl n = 1	SDMA ≥ 45 µg/dl n = 0
sCr (mg/dL)	1,8 (A10)	1,2 (A7) ; 1,7 (A8) ; 1,9 (A9) ; 1,4 (A11)	1,3 (A12)	-
EMM (0 – 3)	3 (A10)	1 (A7) ; 2 (A8) ; 2 (A9) ; 2 (A11)	3 (A12)	-
Grupo A - CTM M5	SDMA ≤ 14 µg/dl n = 0	SDMA: 15-24 µg/dl n = 3	SDMA: 25-44 µg/dl n = 3	SDMA ≥ 45 µg/dl n = 0
sCr (mg/dL)	-	1,1 (A7) ; 1,7 (A10) ; 1,6 (A11)	1,9 (A8) ; 1,9 (A9) ; 1,8 (A12)	-
EMM (0 – 3)	-	1 (A7) ; 3 (A10) ; 2 (A11)	2 (A8) ; 2 (A9) ; 3 (A12)	-

Quadro 6 - Resumo das alterações nas concentrações de creatinina sérica (sCr) e dimetilarginina simétrica sérica (SDMA), bem como avaliação da evolução de estágio da doença renal crônica (DRC), nos cães do Grupo A – SF e CTM. São Paulo, 2019.

Alteração	Grupo A - SF	Grupo A – CTM
Início no estágio 3 pela sCr	--	--
Início no estágio 3 pela SDMA	A4	A11
sCr > 2,0 mg/dL (tempo)	A1 (M4 e 5); A3 (M5)	A12 (M3)
Alteração persistiu (evoluiu de estágio)?	A1; A3	--
SDMA > 24 µg/dL (tempo)	A1 (M4 e 5); A2 (M3 e 5); A3 (M3 e 5); A4 (M1, 2 e 5); A5 (M4)	A8 (M3 e 5); A9 (M3 e 5); A11 (M1, 2 e 3); A12 (M3, 4 e 5)
Alteração persistiu (evoluiu de estágio)?	A1; A2; A3; A4	A8; A9; A12

Nenhum dos cães iniciou o acompanhamento apresentando concentrações de sCr > 2,0 mg/dL, ou seja, no intervalo para classificação no estágio 3 da DRC, por outro lado, observando-se as determinações de SDMA, um cão de cada subgrupo (A4 – SF e A11 – CTM) apresentou no primeiro momento (M1) SDMA > 24 µg/dL.

Cerca de 66% dos cães do subgrupo A – SF (A1, A2, A3 e A4) evoluíram para o estágio 3 da DRC pela SDMA, sendo que destes, apenas os cães A1 e A3 também evoluíram de estágio pela sCr. No subgrupo A – CTM, 50% dos cães (A8, A9 e A12) evoluíram de estágio pela SDMA, sendo que apenas o cão A12 apresentou alteração de sCr para classificação no estágio 3 da DRC, porém essa alteração não foi persistente ao longo do tempo. O perfil das concentrações de SDMA individuais, em cada momento avaliado estão representados nos gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 - Variação individual das concentrações séricas de SDMA ($\mu\text{g/dL}$) nos cães do Grupo A – SF (DRC estágio 2 que receberam terapia placebo), nos momentos M1 a M5. São Paulo, 2019.

Legenda: SDMA: dimetilarginina simétrica; A1 – A6: identificação dos cães pertencentes ao Grupo A – SF; M1 – M5: momentos de avaliação em intervalos de três meses (± 20 dias). Linhas tracejadas: limite de SDMA para estágio 2 da DRC (15 - 24 $\mu\text{g/dL}$).

Gráfico 2 - Variação individual das concentrações séricas de SDMA ($\mu\text{g/dL}$) nos cães do Grupo A – CTM (DRC estágio 2 que receberam terapia com células-tronco mesenquimais), nos momentos M1 a M5. São Paulo, 2019.

Legenda: SDMA: dimetilarginina simétrica; A7 – A12: identificação dos cães pertencentes ao Grupo A – CTM; M1 – M5: momentos de avaliação em intervalos de três meses (± 20 dias). Linhas tracejadas: limite de SDMA para estágio 2 da DRC (15 - 24 $\mu\text{g/dL}$).

Avaliando as concentrações de sCr do Grupo A em relação ao Grupo C, a mediana do Grupo A (1,670) foi maior que a do Grupo C (1,00) ($P < 0,0001$). Quanto ao SDMA, o Grupo A apresentou média $\pm$ EPM de $22,05 \pm 0,6670$, sendo esta também maior ($P < 0,0001$) em relação à média $\pm$ EPM do Grupo C ($8,769 \pm 0,6994$).

Gráfico 3 - Variação média ($\pm$ DP) das concentrações séricas de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo A – SF em comparação com Grupo A – CTM, durante período de estudo (T0 a T12). São Paulo, 2019.

Legenda: sCr: creatinina sérica; SF: solução fisiológica (grupo placebo); CTM: células-tronco mesenquimais; T0 a T12: intervalos mensais de acompanhamento.

A concentração média $\pm$ DP de sCr em T0 do Grupo A – SF foi $1,65 \pm 0,187$ mg/dL, enquanto para o Grupo A – CTM foi $1,56 \pm 0,156$ mg/dL. Com o decorrer do período de acompanhamento, observa-se pelo gráfico 3 que os valores de médios de sCr foram maiores a partir de T7 para o grupo A – SF, assim como seu desvio padrão, em T12 a média $\pm$ DP para o Grupo A - SF foi $1,733 \pm 0,1892$ e para o grupo A – CTM foi $1,564 \pm 0,1462$. Portanto, no Grupo A – SF houve um aumento médio das concentrações de sCr, enquanto no grupo A – CTM essas concentrações médias se mantiveram estáveis ao longo do acompanhamento, no entanto não houve diferença entre as médias obtidas no dois subgrupos ($P = 0,0349$).

Gráfico 4 - Delta (sCr (última – T0) / sCr T0) das concentrações séricas de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo A – SF em comparação com Grupo A – CTM. São Paulo, 2019.

Pelo gráfico 4 observa-se a variação dos valores de sCr do tempo final em relação aos valores iniciais (T0) (delta) de cada animal em seu respectivo grupo. Embora, o grupo A – SF ($0,049 \pm 0,1064$, média $\pm$ DP) tenha apresentado maior variação em relação ao grupo A – CTM ($0,034 \pm 0,0649$), não houve diferença entre os deltas calculados para os dois subgrupos ($P = 0,9035$).

Gráfico 5 - Variação média ($\pm$ DP) das concentrações séricas de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$) dos cães do Grupo A – SF em comparação com Grupo A – CTM, durante período de estudo (M1 a M5). São Paulo, 2019.

Legenda: SDMA: dimetilarginina simétrica; SF: solução fisiológica (grupo placebo); CTM: células-tronco mesenquimais; M1 a M5: momentos de avaliação a cada 3 meses (± 20 dias).

O gráfico 5 configura que em média, os valores de SDMA ao longo dos momentos avaliados foram muito próximos, sendo que em M1, a média $\pm$ DP do Grupo A – SF foi $21,83 \pm 2,482 \mu\text{g/dL}$ e em M5 foi $24,0 \pm 4,382 \mu\text{g/dL}$, enquanto para o Grupo A – CTM as médias $\pm$ DP em M1 e M5 foram $18,67 \pm 1,978 \mu\text{g/dL}$ e $24,33 \pm 7,554 \mu\text{g/dL}$, respectivamente. Não houve diferença entre as médias de SDMA de ambos os subgrupos ($P = 0,2222$).

Gráfico 6 - Delta (SDMA (última – T0) / SDMA T0) das concentrações séricas de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$) dos cães do Grupo A – SF em comparação com Grupo A – CTM. São Paulo, 2019.

Embora o gráfico 6 sugira um maior delta de SDMA no grupo A – CTM em relação ao Grupo A - SF, quando comparados, ambos são iguais ($P = 0,3198$).

Quanto à comparação entre os subgrupos pela ureia sérica (sU), observa-se uma inversão das médias ao longo do tempo, sendo que no tempo T0 o Grupo A – CTM apresentava média $\pm$ DP maior ($74,3 \pm 39,8 \text{ mg/dL}$) em relação ao Grupo A – SF ($58,6 \pm 10,8 \text{ mg/dL}$), e no tempo T12 a média $\pm$ DP do Grupo A – CTM foi de $56,9 \pm 20,5 \text{ mg/dL}$, enquanto que para o Grupo A – SF foi de $74,5 \pm 33,3 \text{ mg/dL}$ (Gráfico 7). Assim, houve uma redução das concentrações médias de ureia no subgrupo A – CTM, em relação ao subgrupo A – SF, no entanto, não foi encontrada diferença entre as avaliações ($P = 0,5854$).

Gráfico 7 - Variação média ($\pm$ DP) das concentrações séricas de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo A – SF em comparação com Grupo A – CTM, durante período de estudo (T0 a T12). São Paulo, 2019.

Legenda: SF: solução fisiológica (grupo placebo); CTM: células-tronco mesenquimais.

Gráfico 8 - Delta (sU (última – T0) / sU T0) das concentrações séricas de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo A – SF em comparação com Grupo A – CTM. São Paulo, 2019.

A avaliação do delta do Grupo A detectou que no subgrupo que recebeu a terapia com células-tronco mesenquimais (A – CTM) ocorreu uma diminuição das concentrações de sU no tempo final em relação ao inicial, sendo que no subgrupo A – SF ocorreu o oposto, no entanto não houve diferença entre os deltas dos subgrupos ($P = 0,2505$).

5.3 GRUPO B (CÃES COM DRC ESTÁGIO 3)

A idade média ($\pm$ DP) dos cães do Grupo B ($n = 15$) foi $9,3 \pm 5$ anos, sendo entre os subgrupos SF e CTM, a variação de idade foi semelhante. A distribuição racial foi heterogênea, predominando as raças Poodle, Yorkshire e Lhasa Apso, cada uma com 2 cães (13,3%). A porcentagem entre os dois sexos foi homogênea (46,7% de fêmeas e 53,3% de machos), distribuídos semelhantemente entre os dois subgrupos (SF e CTM). As identificações e características individuais encontram-se no quadro seguinte.

Quadro 7 - Identificação dos cães com doença renal crônica do GRUPO B (estágio 3) de B1 a B15, divididos conforme os subgrupos em B – SF (animais que receberam aplicação de solução fisiológica) e B – CTM (cães que receberam a aplicação de células-tronco mesenquimais), de acordo com idade (anos), peso (kg), definição racial, sexo e ocorrência de óbito no período de estudo, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, 2019.

Grupo	Cão	Idade (anos)	Peso (kg)	Raça	Sexo	Óbito no estudo?
B – SF	B1	2	4,5	Shi tzu	Fêmea	Não
	B2	10	5,9	Poodle	Macho	Sim (T5)
	B3	12	3,5	Yorkshire	Macho	Sim (T3)
	B4	16	8,6	Fox Paulistinha	Macho	Não
	B5	7,7	41,5	Pastor Alemão	Fêmea	Não
	B6	5,3	6,6	Lhasa Apso	Fêmea	Sim (T4)
	B7	11,2	8,5	Lhasa Apso	Macho	Não
B – CTM	B8	2	26,5	Golden Retriever	Fêmea	Sim (T9)
	B9	10	2,6	Yorkshire	Macho	Não
	B10	11	2,9	Pinscher	Macho	Não
	B11	10	42,0	Pitbull	Macho	Sim (T2)
	B12	17	7,3	SRD	Fêmea	Sim (T4)
	B13	16	3,8	Poodle	Fêmea	Sim (T1)
	B14	8	3,7	Teckel	Macho	Sim (T6)
	B15	1,5	26,7	Viszla	Fêmea	Não

Legenda: SRD: sem raça definida; B1 a B15: cães com DRC estágio 3.

Dos cães incluídos neste grupo, oito vieram à óbito antes do término do estudo, três pertenciam ao Grupo B – SF (B2, B3 e B6) e cinco ao Grupo B – CTM (B8, B11, B12, B13 e B14).

O animal B2 apresentava insuficiência valvar crônica de mitral desenvolvendo, no período logo após T5, edema pulmonar agudo refratário à terapia, evoluindo para óbito. Os cães B3, B6 e B12 apresentaram descompensação da DRC com crise urêmica, sendo que este último apresentou também agravamento

da acidose metabólica, evoluindo para óbito nos períodos logo após T3, T4 e T4, respectivamente. O cão B8 era um animal jovem, cuja doença evoluiu rapidamente ao longo de nove meses, com acidose metabólica e óbito. O cão B13 apresentava dor crônica secundária à discopatia, e em momento de crise de dor foi realizada eutanásia, assistida por serviço particular/externo, por opção do tutor, no período logo após T1. Os animais B11 e B14 vieram a óbito logo após T2 e T6, respectivamente, por descompensação da DRC. Ainda o animal B5, sua tutora abandonou o estudo antes do período final, por motivos pessoais.

Alguns animais apresentaram ao longo do estudo alterações provenientes da DRC e receberam terapia preconizada individualmente (Quadro 8). Foram avaliados ainda, em cada tempo do acompanhamento, o escore de massa muscular (EMM) e o escore de condição corporal (ECC) dos cães (Quadros 9 e 10, respectivamente).

Quadro 8 - Eventos secundários à disfunção renal que ocorreram em alguns cães do Grupo B – SF (cães no estágio 3 da DRC que receberam solução fisiológica placebo) e do Grupo B – CTM (cães no estágio 3 da DRC que receberam terapia com células-tronco mesenquimais), durante os períodos de T0 a T12, bem como terapia preconizada. São Paulo, 2019.

Grupo B - SF	Evento	Tempo	Tratamento
B1	Hiperfosfatemia	T1	Hidróxido de Alumínio - VO
B2	Anemia discreta	T1	-
B3	Hiperfosfatemia / acidose metabólica	T0 / T1	Hidróxido de Alumínio - VO / BIC - VO
B4	Acidose metabólica	T0	BIC - VO
B5	Anemia discreta	T0	-
B6	Acidose metabólica	T2	BIC – VO, citrato de potássio - VO
B7	Acidose metabólica/ pielonefrite/ hiperfosfatemia/ anemia discreta	T1/T7/T8/T11	BIC – VO/ Enrofloxacina – VO/ Hidróxido de alumínio - VO
Grupo B - CTM	Evento	Tempo	Tratamento
B8	Acidose metabólica/ hiperfosfatemia	T2/T5	BIC – VO/ hidróxido de alumínio - VO
B9	Acidose metabólica/ hiperfosfatemia	T7/T6	BIC – VO/ carbonato de cálcio - VO
B10	Acidose metabólica/ anemia/ hiperfosfatemia	T0/T0/T8	BIC – VO/ eritropoietina em T6 - SC
B11	Anemia/ acidose metabólica	T0/ T1	Eritropoietina em T0 – SC/ BIC – VO/ hidróxido de alumínio - VO
B12	Anemia/ acidose metabólica/ hiperfosfatemia	T0	BIC – VO/ hidróxido de alumínio - VO
B14	Acidose metabólica/ hiperfosfatemia	T1/ T3	BIC - VO
B15	Hiperfosfatemia/ Acidose metabólica/ Anemia discreta	T1/ T7/T8	Hidróxido de Alumínio – VO/ BIC - VO

Legenda: B: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 2 (IRIS); SF: grupo que recebeu solução fisiológica; CTM: grupo que recebeu células-tronco mesenquimais; BIC: bicarbonato de sódio; VO: via oral; ITU: infecção do trato urinário.

Quadro 9 - Escore de massa muscular (EMM: 0 - 3) dos cães do Grupo B (doentes renais crônicos estágio 3), classificados em subgrupos B - SF (cães que receberam solução fisiológica) e B – CTM (cães que receberam células-tronco mesenquimais), nos períodos de acompanhamento do estudo (T0 a T12), atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, 2019.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
B1 SF	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
B2 SF	2	2	2	2	2	2†							
B3 SF	1	1	1	1†									
B4 SF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5 SF	2	2	2	2	2*								
B6 SF	2	2	2	2	2†								
B7 SF	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2
B8 CTM	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2†			
B9 CTM	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
B10 CTM	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
B11 CTM	2	2	2†										
B12 CTM	2	2	2	2	2†								
B13 CTM	1	1†											
B14 CTM	3	3	3	3	3	3	3†						
B15 CTM	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Legenda: B: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS); SF: grupo que recebeu solução fisiológica; CTM: grupo que recebeu células-tronco mesenquimais; *: animal acompanhado até T4; †: óbito.

Quadro 10 - Escore de condição corpórea (ECC: 1 - 9) dos cães do Grupo B (DRC estágio 3), classificados em subgrupos B - SF (cães que receberam solução fisiológica) e B – CTM (cães que receberam células-tronco mesenquimais), nos períodos de acompanhamento do estudo (T0 a T12), atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo, 2019.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
B1 SF	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
B2 SF	5	5	5	5	5	5†							
B3 SF	4	4	4	4†									
B4 SF	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
B5 SF	6	5	5	5	5*								
B6 SF	5	5	5	5	5†								
B7 SF	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	5
B8 CTM	6	6	6	6	6	5	5	5	5	5†			
B9 CTM	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
B10 CTM	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
B11 CTM	5	5	4†										
B12 CTM	5	5	5	5	5†								
B13 CTM	4	4†											
B14 CTM	6	6	6	6	6	6†							
B15 CTM	6	6	6	5	5	6	6	6	5	5	5	5	5

Legenda: B: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS); SF: grupo que recebeu solução fisiológica; CTM: grupo que recebeu célula tronco mesenquimal; *: animal acompanhado até T4; †: óbito.

Quanto ao escore de massa muscular (EMM) dos cães incluídos no Grupo B, 33,3% apresentavam o EMM = 3/3, 46,7% o EMM = 2/3 e 20% apresentavam EMM = 1/3. Um cão de cada subgrupo (B7 – SF e B8 – CTM) apresentou redução

do EMM de 3/3 para 2/3 em T8 e T6, respectivamente. Em relação ao escore de condição corporal (ECC), 60% (n = 9) dos cães encontravam-se no escore ideal (ECC = 4/9 e 5/9), enquanto 40% (n = 6) apresentavam ECC = 6/9, faixa que indica sobrepeso. Ao longo do estudo, no entanto, 50% (n = 3) desses cães com sobrepeso reduziram o ECC de 6/9 para 5/9.

Os resultados das concentrações séricas de creatinina (sCr) e ureia (sU) avaliadas mensalmente de T0 a T12, ou até o óbito, estão descritos nas tabelas 10, 11, 12 e 13, assim como a estatística descritiva referente aos resultados de cada animal. Os resultados de dimetilarginina simétrica (SDMA), avaliados trimestralmente em cinco momentos (M1 a M5), estão nas tabelas 14 e 15, associados à sCr e sU respectivas aos momentos avaliados, bem como à estatística descritiva.

Tabela 10 - Valores individuais da concentração sérica de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo B - SF, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

Grupo B - SF	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
sCr T0	2,5	2,4	2,7	2,4	2,8	2,4	2,2
sCr T1	2,2	1,9	3,0	2,4	3,1	2,4	2,2
sCr T2	2,5	1,8	3,9	2,9	2,9	NR	3,0
sCr T3	2,5	2,5	3,4†	2,6	3,0	2,2†	3,4
sCr T4	2,4	3,8		2,5	3,4		2,8
sCr T5	2,5	2,1†		3,1	*		2,7
sCr T6	2,7			3,1			2,8
sCr T7	2,9			2,7			3,1
sCr T8	3,0			2,6			3,0
sCr T9	3,1			3,3			3,4
sCr T10	3,1			3,0			3,3
sCr T11	2,9			3,4			3,4
sCr T12	2,8			4,1			3,3
Média	2,7	2,4	3,3	2,9	3,0	2,3	3,0
Mediana	2,7	2,3	3,2	2,9	3,0	2,4	3,0
DP	0,29	0,73	0,52	0,48	0,23	0,12	0,41
CV (%)	10,69%	30,23%	15,99%	16,51%	7,57%	4,95%	14,00%
EPM	0,08	0,30	0,26	0,13	0,10	0,07	0,11
Mínimo	2,2	1,8	2,7	2,4	2,8	2,2	2,2
Máximo	3,1	3,8	3,9	4,1	3,4	2,4	3,4
Perc. 25%	2,5	2,0	2,9	2,6	2,9	2,3	2,8
Perc. 75%	2,9	2,5	3,5	3,1	3,1	2,4	3,3

Legenda: B: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS); SF: grupo que recebeu solução fisiológica; *: animal acompanhado até T4; †: óbito.

Tabela 11 - Valores individuais da concentração sérica de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo B - CTM, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

Grupo B - CTM	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15
sCr T0	4,2	2,3	2,1	4,7	4,4	3,2	2,5	2,8
sCr T1	4,7	2,3	1,8	6,3	4,3	2,6†	3,2	3,1
sCr T2	4,6	2,6	2,7	7,1†	4,1		2,4	3,4
sCr T3	5,9	2,7	3,1		4,2		3,1	3,8
sCr T4	5,4	2,7	2,9		4,3†		2,8	3,7
sCr T5	4,9	2,5	2,8				3,7	4,2
sCr T6	6,1	2,8	2,4				4,0†	4,5
sCr T7	6,2	2,5	2,6					5,1
sCr T8	6,5	2,9	2,9					5,0
sCr T9	6,4†	3,1	2,1					3,4
sCr T10		3,5	3,0					4,5
sCr T11		3,3	3,3					3,9
sCr T12		3,6	3,3					5,0
Média	5,5	2,8	2,7	6,0	4,3	2,9	3,1	4,0
Mediana	5,7	2,7	2,8	6,3	4,3	2,9	3,1	3,9
DP	0,84	0,43	0,47	1,22	0,11	0,42	0,59	0,76
CV (%)	15,27%	15,15%	17,58%	20,25%	2,68%	14,63%	19,17%	18,72%
EPM	0,27	0,12	0,13	0,71	0,05	0,30	0,22	0,21
Mínimo	4,2	2,3	1,8	4,7	4,1	2,6	2,4	2,8
Máximo	6,5	3,6	3,3	7,1	4,4	3,2	4	5,1
Perc. 25%	4,8	2,5	2,4	5,5	4,2	2,8	2,7	3,4
Perc. 75%	6,2	3,1	3,0	6,7	4,3	3,1	3,5	4,5

Legenda: B: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS); CTM: grupo que recebeu células-tronco mesenquimais; †: óbito.

Tabela 12 - Valores individuais da concentração sérica de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo B - SF, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

Grupo B - SF	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
sU T0	92,3	183,2	271,2	63,0	101,1	212,0	88,1
sU T1	101,9	133,2	338,1	64,9	66,1	219,4	75,7
sU T2	90,2	134,6	311,4	70,0	68,4	NR	92,9
sU T3	77,9	163,4	316,0†	98,3	64,5	221,0†	72,1
sU T4	100,8	292,8		146,8	83,1		110,9
sU T5	83,2	136,2†		153,9	*		97,6
sU T6	129,5			161,1			100,2
sU T7	101,2			162,2			116,5
sU T8	97,7			179,3			127,7
sU T9	117,2			223,6			157,5
sU T10	114,0			157,4			102,7
sU T11	85,8			202,8			105,2
sU T12	119,8			283,9			129,0
Média	100,9	173,9	309,2	151,3	76,6	217,5	105,9
Mediana	100,8	149,8	313,7	157,4	68,4	219,4	102,7
DP	15,50	61,57	27,87	65,32	15,54	4,80	23,20
CV (%)	15,36%	35,41%	9,01%	43,17%	20,28%	2,21%	21,92%
EPM	4,30	25,14	13,94	18,12	6,95	2,77	6,44
Mínimo	77,9	133,2	271,2	63,0	64,5	212,0	72,1
Máximo	129,5	292,8	338,1	283,9	101,1	221,0	157,5
Perc. 25%	90,2	135,0	301,4	98,3	66,1	215,7	92,9
Perc. 75%	114,0	178,3	321,5	179,3	83,1	220,2	116,5

Legenda: B: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS); SF: grupo que recebeu solução fisiológica; *: animal acompanhado até T4; †: óbito.

Tabela 13 - Valores individuais da concentração sérica de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo B – CTM, nos tempos T0 a T12; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo e máximo, e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

Grupo B - CTM	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15
sU T0	171,3	153,3	185,8	252,6	318,8	300,7	200,7	106,8
sU T1	222,9	196,0	154,7	310,0	247,9	190,4†	274,3	122,6
sU T2	210,9	182,9	188,0	336,3†	201,7		252,7	370,0
sU T3	237,7	283,6	256,5		280,6		246,1	177,7
sU T4	199,8	204,1	226,7		202,9†		195,8	127,0
sU T5	213,7	206,0	183,8				196,4	156,5
sU T6	354,9	277,3	230,4				240,3†	161,5
sU T7	258,8	282,6	227,9					156,3
sU T8	276,5	276,6	277,7					158,4
sU T9	456,0†	336,3	187,1					144,3
sU T10		320,6	303,6					148,4
sU T11		330,7	335,3					154,4
sU T12		322,4	291,7					178,4
Média	260,3	259,4	234,6	299,6	250,4	245,6	229,5	166,3
Mediana	230,3	277,3	227,9	310,0	247,9	245,6	240,3	156,3
DP	85,38	62,91	55,07	42,80	50,56	77,99	31,62	64,54
CV (%)	32,81%	24,25%	23,48%	14,28%	20,19%	31,76%	13,78%	38,80%
EPM	27,00	17,45	15,27	24,71	22,61	55,15	11,95	17,90
Mínimo	171,3	153,3	154,7	252,6	201,7	190,4	195,8	106,8
Máximo	456,0	336,3	335,3	336,3	318,8	300,7	274,3	370,0
Perc. 25%	211,6	204,1	187,1	281,3	202,9	218,0	198,6	144,3
Perc. 75%	272,1	320,6	277,7	323,2	280,6	273,1	249,4	161,5

Legenda: B: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS); CTM: grupo que recebeu células-tronco mesenquimais; †: óbito.

Tabela 14 - Valores individuais da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$), creatinina (sCr) (mg/dL) e ureia (sU) (mg/dL), dos cães do Grupo B – SF (B1 a B7), nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo (mín.) e máximo (máx.), e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

B - SF	B1			B2			B3			B4			B5			B6			B7		
	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia
M1	19	2,5	92,3	28	2,4	183,2	46	2,7	271,2	22	2,4	63	60	3,1	66,1	11	2,4	212,0	12	2,24	88,1
M2	25	2,4	100,8	33	3,8	292,8	55†	3,4†	316,0†	15	2,6	98,3	40	3,0	64,5	15†	2,4†	219,4†	33	3,36	72,1
M3	25	2,9	101,2	31†	2,1†	136,2†				20	3,1	161,1							28	2,8	100,2
M4	26	3,1	117,2							27	3,3	157,4							16	3,4	157,5
M5	29	2,8	119,8							27	4,1	283,9							23	3,3	129,0
Média	25	2,7	106,3	31	2,8	204,1	51	3,1	293,6	22	3,1	152,7	50	3,1	65,3	13	2,4	215,7	22	3,02	109,4
Mediana	25	2,8	101,2	31	2,4	183,2	50,5	3,05	293,6	22	3,1	157,4	50	3,05	65,3	13	2,4	215,7	23	3,30	100,2
DP	3,63	0,29	11,76	2,52	0,91	80,36	6,36	0,49	31,68	5,07	0,67	84,13	14,14	0,07	1,13	2,83	0,00	5,23	8,56	0,50	34,01
CV (%)	14,65	10,51	11,07	8,21	32,80	39,38	12,60	16,23	10,79	22,84	21,52	55,08	28,28	2,32	1,73	21,76	0,00	2,43	38,22	16,52	31,10
EPM	1,62	0,13	5,26	1,45	0,52	46,39	4,5	0,35	22,4	2,27	0,30	37,62	10	0,05	0,8	2	0	3,7	3,83	0,22	15,21
Mínimo	19	2,4	92,3	28	2,1	136,2	46	2,7	271,2	15	2,4	63	40	3	64,5	11	2,4	212	12	2,24	72,1
Máximo	29	3,1	119,8	33	3,8	292,8	55	3,4	316	27	4,1	283,9	60	3,1	66,1	15	2,4	219,4	33	3,4	157,5
Perc. 25%	25	2,5	100,8	29,5	2,25	159,7	48,25	2,875	282,4	20	2,6	98,3	45	3,025	64,9	12	2,4	213,85	16	2,8	88,1
Perc. 75%	26	2,9	117,2	32	3,1	238	52,75	3,225	304,8	27	3,3	161,1	55	3,075	65,7	14	2,4	217,55	28	3,36	129

Legenda: B: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS); SF: grupo que recebeu solução fisiológica; *: animal acompanhado até T4; †: óbito.

Tabela 15 - Valores individuais da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$), creatinina (sCr) (mg/dL) e ureia (sU) (mg/dL), dos cães do Grupo B – CTM (B8 a B15), nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; bem como estatística descritiva dos dados: média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro padrão da média (EPM), valores mínimo (mín.) e máximo (máx.), e percentis 25% (Perc. 25%) e 75% (Perc. 75%). São Paulo – 2019.

B - CTM	B8			B9			B10			B11			B12			B13			B14			B15		
	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia	SDMA	sCr	Ureia
M1	47	4,2	171,3	39	2,3	153,3	32	2,1	185,8	60	4,7	252,6	61	4,4	318,8	68	3,2	300,7	39	2,5	200,7	30	2,84	106,8
M2	40	5,9	237,7	38	2,7	283,6	50	3,1	256,5	72†	7,1†	336,3†	33	4,2	280,6	67†	2,6†	190,4†	50	3,1	246,1	31	3,77	177,7
M3	86	6,1	354,9	40	2,8	277,3	44	2,4	230,4				79†	4,3†	202,9†				44	3,7	196,4	30	4,52	161,5
M4	114†	12,9†	456†	60	2,9	276,6	48	2,1	187,1										60†	4,0†	240,3†	20	3,4	144,3
M5				59	3,6	322,4	49	3,3	291,7												26	5,0	178,4	
Média	72	7,3	305,0	47	2,9	262,6	45	2,6	230,3	66	5,9	294,5	58	4	267	68	2,9	245,6	48	3,3	220,9	27	3,91	153,7
Mediana	67	6	296,3	40	2,8	277,3	48	2,4	230,4	66	5,9	294,45	61	4,3	280,6	67,5	2,9	245,5	47	3,4	220,5	30	3,77	161,5
DP	34,68	3,85	126,09	11,26	0,47	63,98	7,40	0,57	45,56	8,49	1,70	59,18	23,18	0,10	59,1	0,71	0,42	77,9	9,03	0,67	25,9	4,6	0,86	29,7
CV (%)	48,34	52,86	41,34	23,85	16,51	24,36	16,60	21,76	19,78	12,86	28,76	20,10	40,20	2,33	22,1	1,05	14,63	31,8	18,72	20,01	11,75	16,6	22,12	19,3
EPM	17,34	1,92	63,04	5,03	0,21	28,61	3,31	0,25	20,38	6	1,2	41,85	13,38	0,06	34,1	0,5	0,3	55,1	4,52	0,33	12,9	2,04	0,39	13,3
Mínimo	40	4,2	171,3	38	2,3	153,3	32	2,1	185,8	60	4,7	252,6	33	4,2	202,9	67	2,6	190,4	39	2,5	196,4	20	2,84	106,8
Máximo	114	12,9	456	60	3,6	322,4	50	3,3	291,7	72	7,1	336,3	79	4,4	318,8	68	3,2	300,7	60	4	246,1	31	5,00	178,4
Perc. 25%	45,25	5,48	221,1	39	2,7	276,6	44	2,1	187,1	63	5,3	273,53	47	4,25	241,7	67,25	2,75	217,9	42,75	2,95	199,6	26	3,40	144,3
Perc. 75%	93	7,8	380,2	59	2,9	283,6	49	3,1	256,5	69	6,5	315,4	70	4,35	299,7	67,75	3,05	273,1	52,5	3,775	241,8	30	4,52	177,7

Legenda: B: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS); CTM: grupo que recebeu células-tronco mesenquimais; †: óbito.

O Grupo B – SF apresentou valores médios ($\pm$ DP) de sCr na faixa de 2,3 ($\pm$ 0,73) (B6) a 3,3 ($\pm$ 0,52) mg/dL (B3), portanto dentro dos valores estabelecidos para o estágio 3 da DRC. O coeficiente de variação (CV) foi baixo, entre 4,95% no animal B6 e 16,51% no B4, com exceção do animal B2 que apresentou maior variação dos resultados (30,23%). Os valores mínimos para sCr desse subgrupo foram de 1,8 (B2) a 2,8 mg/dL (B5) e os valores máximos de 2,4 (B6) a 4,1 mg/dL (B4).

Em relação ao Grupo B – CTM, os valores médios ($\pm$ DP) de sCr dos animais foram de 2,7 ($\pm$ 0,47) (B10) a 6,0 ($\pm$ 1,22) mg/dL (B11), e o coeficiente de variação de 2,68% (B12) a 20,25% (B11). Os valores mínimos variaram de 2,3 (B9) - 4,7 mg/dL (B11) e os valores máximos, de 3,2 (B13) – 7,1 mg/dL (B11).

No Grupo B – SF os valores médios $\pm$ DP de ureia (sU) foram de 76,6 $\pm$ 15,54 (B5) a 309,2 $\pm$ 61,57 mg/dL (B3), o intervalo do coeficiente de variação individual foi de 2,21% (B6) a 43,17% (B4). Os valores mínimos variaram de 63 (B4) a 271,2 mg/dL (B3) e os valores máximos de 101,1 (B5) a 338,1 mg/dL (B3).

O Grupo B – CTM apresentou valores médios $\pm$ DP de sU variando de 166,3 $\pm$ 64,54 (B15) a 299,6 $\pm$ 42,8 mg/dL (B11), o coeficiente de variação foi de 14,28% (B11) a 38,8 % (B15). Os valores mínimos variaram de 106,8 (B15) a 252,6 mg/dL (B11), enquanto que os valores máximos foram de 300,7 (B13) a 456,0 mg/dL (B8).

A média $\pm$ DP dos valores de SDMA para o Grupo B – SF variou de 13 ($\pm$ 2,83) (B6) a 51 ($\pm$ 6,36) μ g/dL (B3), sendo que o coeficiente de variação ocorreu entre 8,21% (B2) a 38,22% (B7). O valor mínimo variou entre os indivíduos de 11 (B6) a 46 μ g/dL (B3) e o valor máximo de 15 (B6) a 60 μ g/dL (B5). Esses dados em conjunto demonstram a grande diferença de função renal entre os cães avaliados, ou seja, a heterogeneidade do grupo (Tabela 14).

No Grupo B – CTM, a média ($\pm$ DP) de SDMA foi de 27 ($\pm$ 4,6) (B15) a 72 ($\pm$ 34,68) μ g/dL (B8), o coeficiente de variação foi de 1,05% (B13) a 48,34% (B8). O valor mínimo variou de 20 (B15) a 67 μ g/dL (B13) e o valor máximo de 31 (B15) a 114 μ g/dL (B8), portanto refletindo grande diferença de progressão da doença entre os indivíduos e ainda que os cães incluídos no subgrupo CTM estavam mais avançados no estágio da DRC em relação ao subgrupo SF (Tabela 15).

As tabelas 16 e 17 apresentam as concentrações de sCr, bem como o EMM dos animais dos Grupos B – SF e CTM, respectivamente, de acordo com a faixa de

SDMA em que cada animal se encontrou ao longo dos momentos avaliados (M1 a M5). O Quadro 11 resume as evoluções de estágio apresentadas por estes animais.

Tabela 16 - Valores das faixas de SDMA sérica correspondentes aos estágios da DRC (IRIS, 2015), dos cães do Grupo B – SF nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; relacionados com a concentração de creatinina sérica (sCr) e escore de massa muscular (EMM) respectivos. São Paulo – 2019.

Grupo B - SF M1	Normalidade SDMA $\leq$ 14 $\mu\text{g/dl}$ n = 2	Estágio 2 SDMA: 15-24 $\mu\text{g/dl}$ n = 2	Estágio 3 SDMA: 25-44 $\mu\text{g/dl}$ n = 1	Estágio 4 SDMA $\geq$ 45 $\mu\text{g/dl}$ n = 2
sCr (mg/dL)	2,4 (B6); 2,24 (B7)	2,5 (B1); 2,4 (B4)	2,4 (B2)	2,7 (B3); 3,1 (B5)
EMM (0 – 3)	2 (B6); 3 (B7)	3 (B1); 1 (B4)	2 (B2)	1 (B3); 2 (B5)
Grupo B - SF M2	SDMA $\leq$ 14 $\mu\text{g/dl}$ n = 0	SDMA: 15-24 $\mu\text{g/dl}$ n = 2	SDMA: 25-44 $\mu\text{g/dl}$ n = 4	SDMA $\geq$ 45 $\mu\text{g/dl}$ n = 1
sCr (mg/dL)	-	2,6 (B4); 2,4 (B6)	2,4 (B1); 3,8 (B2); 3,0 (B5); 3,36 (B7)	3,4 (B3)
EMM (0 – 3)	-	1 (B4); 2 (B6)	3 (B1); 2 (B2); 2 (B5); 3 (B7)	1 (B3)
Grupo B - SF M3	SDMA $\leq$ 14 $\mu\text{g/dl}$ n = 0	SDMA: 15-24 $\mu\text{g/dl}$ n = 1	SDMA: 25-44 $\mu\text{g/dl}$ n = 3	SDMA $\geq$ 45 $\mu\text{g/dl}$ n = 0
sCr (mg/dL)	-	3,1 (B4)	2,9 (B1); 2,1 (B2); 2,8 (B7)	-
EMM (0 – 3)	-	1 (B4)	3 (B1); 2 (B2); 3 (B7)	-
Grupo B - SF M4	SDMA $\leq$ 14 $\mu\text{g/dl}$ n = 0	SDMA: 15-24 $\mu\text{g/dl}$ n = 1	SDMA: 25-44 $\mu\text{g/dl}$ n = 2	SDMA $\geq$ 45 $\mu\text{g/dl}$ n = 0
sCr (mg/dL)	-	3,4 (B7)	3,1 (B1); 3,3 (B4)	-
EMM (0 – 3)	-	2 (B7)	3 (B1); 1 (B4)	-
Grupo B - SF M5	SDMA $\leq$ 14 $\mu\text{g/dl}$ n = 0	SDMA: 15-24 $\mu\text{g/dl}$ n = 1	SDMA: 25-44 $\mu\text{g/dl}$ n = 2	SDMA $\geq$ 45 $\mu\text{g/dl}$ n = 0
sCr (mg/dL)	-	3,3 (B7)	2,8 (B1); 4,1 (B4)	-
EMM (0 – 3)	-	2 (B7)	3 (B1); 1 (B4)	-

Tabela 17 - Valores das faixas de SDMA sérica correspondentes aos estágios da DRC (IRIS, 2015), dos cães do Grupo B – CTM nos períodos descritos “momentos” M1 a M5; relacionados com a concentração de creatinina sérica (sCr) e escore de massa muscular (EMM) respectivos. São Paulo – 2019.

Grupo B - CTM M1	Normalidade SDMA $\leq$ 14 μ g/dl n = 0	Estágio 2 SDMA: 15-24 μ g/dl n = 0	Estágio 3 SDMA: 25-44 μ g/dl n = 1	Estágio 4 SDMA $\geq$ 45 μ g/dl n = 2
sCr (mg/dL)	-	-	2,3 (B9); 2,1 (B10); 2,5 (B14); 2,84 (B15)	4,2 (B8); 4,7 (B11); 4,4 (B12); 3,2 (B13)
EMM (0 – 3)	-	-	2 (B9); 2 (B10); 3 (B14); 3 (B15)	3 (B8); 2 (B11); 2 (B12); 1 (B13)
Grupo B - CTM M2	SDMA $\leq$ 14 μ g/dl n = 0	SDMA: 15-24 μ g/dl n = 0	SDMA: 25-44 μ g/dl n = 4	SDMA $\geq$ 45 μ g/dl n = 1
sCr (mg/dL)	-	-	5,9 (B8); 2,7 (B9); 4,2 (B12); 3,77 (B15)	3,1 (B10); 7,1 (B11); 2,6 (B13); 3,1 (B14)
EMM (0 – 3)	-	-	3 (B8); 2 (B9); 2 (B12); 3 (B15)	2 (B10); 2 (B11); 1(B13); 3 (B14)
Grupo B - CTM M3	SDMA $\leq$ 14 μ g/dl n = 0	SDMA: 15-24 μ g/dl n = 0	SDMA: 25-44 μ g/dl n = 3	SDMA $\geq$ 45 μ g/dl n = 0
sCr (mg/dL)	-	-	2,8 (B9); 2,4 (B10); 3,7 (B14); 4,52 (B15)	6,1 (B8); 4,3 (B12)
EMM (0 – 3)	-	-	2 (B9); 2 (B10); 3 (B14); 3 (B15)	2 (B8); 2 (B12)
Grupo B - CTM M4	SDMA $\leq$ 14 μ g/dl n = 0	SDMA: 15-24 μ g/dl n = 1	SDMA: 25-44 μ g/dl n = 2	SDMA $\geq$ 45 μ g/dl n = 0
sCr (mg/dL)	-	3,4 (B15)	-	12,9 (B8); 2,9 (B9); 2,1 (B10); 4,0 (B14)
EMM (0 – 3)	-	3 (B15)	-	2 (B8); 2 (B9); 2 (B10); 3 (B14)
Grupo B - CTM M5	SDMA $\leq$ 14 μ g/dl n = 0	SDMA: 15-24 μ g/dl n = 1	SDMA: 25-44 μ g/dl n = 2	SDMA $\geq$ 45 μ g/dl n = 0
sCr (mg/dL)	-	-	5,0 (B15)	3,6 (B9); 3,3 (B10)
EMM (0 – 3)	-	-	3 (B15)	2 (B9); 2 (B10)

Quadro 11 - Resumo das alterações nas concentrações de creatinina sérica (sCr) e dimetilarginina simétrica sérica (SDMA), bem como avaliação da evolução de estágio da doença renal crônica (DRC), nos cães do Grupo B – SF e CTM. São Paulo, 2019.

Alteração	Grupo B - SF	Grupo B – CTM
Início no estágio 4 pela sCr	--	--
Início no estágio 4 pela SDMA	B3 e B5	B8, B11, B12 e B13
sCr > 5,0 mg/dL (tempo)	--	B8 (M2, M3 e M4); B11 (M2)
Alteração persistiu (evoluiu de estágio)?	--	B8 e B11
SDMA > 44 µg/dL (tempo)	B3 (M1 e M2); B5 (M1)	B8 (M1, M3, M4); B9 (M4 e M5); B10 (M2, M4 e M5); B11 (M1 e M2); B12 (M1 e M3); B13 (M1 e M2); B14 (M2 e M4)
Alteração persistiu (evoluiu de estágio)?	B3	B8; B9; B10; B11; B12; B13 e B14

Gráfico 9 - Variação individual das concentrações séricas de SDMA (µg/dL) nos cães do Grupo B – SF (DRC estágio 3 que receberam terapia com solução fisiológica) (B1 a B7), nos momentos M1 a M5. São Paulo, 2019.

Legenda: SDMA: dimetilarginina simétrica; B1 – B7: identificação dos cães pertencentes ao Grupo B – SF; M1 – M5: momentos de avaliação em intervalos de três meses ($\pm$ 20 dias). Linhas tracejadas: limite de SDMA para estágio 3 da DRC (25 - 44 µg/dL).

Gráfico 10 - Variação individual das concentrações séricas de SDMA ($\mu\text{g/dL}$) nos cães do Grupo B – CTM (DRC estágio 3 que receberam terapia com células-tronco mesenquimais) (B8 a B15), nos momentos M1 a M5. São Paulo, 2019.

Legenda: SDMA: dimetilarginina simétrica; B8 – B15: identificação dos cães pertencentes ao Grupo B – CTM; M1 – M5: momentos de avaliação em intervalos de três meses (± 20 dias). Linhas tracejadas: limite de SDMA para estágio 3 da DRC (25 - 44 $\mu\text{g/dL}$).

No Grupo B – SF, 57% dos cães iniciaram o acompanhamento com SDMA abaixo da faixa do estágio 3 da DRC, já 28,6% ($n = 2$) apresentavam concentrações de SDMA na faixa do estágio 4 e destes, apenas 1 cão apresentou persistência do aumento de SDMA ao longo do tempo, evoluindo de estágio da DRC.

No Grupo B – CTM, 50% ($n = 4$) dos cães iniciaram o acompanhamento apresentando valores de SDMA na faixa do estágio 4 da DRC, 37,5% evoluíram para o estágio 4 pelo SDMA ao longo do acompanhamento, enquanto apenas 25% progrediram de estágio pela avaliação da sCr.

Em relação aos dois tratamentos estabelecidos, o Grupo B – CTM apresentou concentrações médias de sCr superiores aos do Grupo B – SF, bem como maiores desvios-padrão (DPs) ($P < 0,0001$). As médias $\pm$ DP para os grupos B – SF e B – CTM no T0 foram respectivamente $2,491 \pm 0,1945$ e $3,28 \pm 1,02$, portanto uma diferença entre médias de 0,798. No tempo T12, a média $\pm$ DP do Grupo B – SF foi $3,4 \pm 0,6557$ e do Grupo B – CTM foi $3,97 \pm 0,9131$, a diferença entre médias foi de 0,57 (Gráfico 11). Essa redução da diferença entre médias entre os dois tratamentos ocorreu pelo menor aumento na média do Grupo B – CTM ao final do

período, mas há de se considerar os óbitos que ocorreram ao longo do tempo de acompanhamento.

Não houve diferença na comparação dos deltas para creatinina sérica (sCr) entre os dois grupos ($P = 0,2306$). Porém observa-se pelo gráfico que o Grupo B – CTM apresentou uma variação maior discreta em relação ao grupo B – SF (Gráfico 12).

Avaliando as concentrações de sCr do Grupo B, a mediana (3,00) foi maior que a do Grupo C (1,00) e do Grupo A (1,676) ($P < 0,0001$). Quanto ao SDMA, o Grupo B apresentou mediana de 35,5, sendo esta também maior ($P < 0,0001$) em relação à mediana do Grupo A (22,0) e do Grupo C (8,0).

Gráfico 11 - Variação média ($\pm$ DP) das concentrações séricas de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo B – SF em comparação com Grupo B – CTM, durante período de estudo (T0 a T12). São Paulo, 2019.

Legenda: sCr: creatinina sérica; SF: solução fisiológica (grupo placebo); CTM: células-tronco mesenquimais; T0 a T12: intervalos mensais de acompanhamento.

Gráfico 12 - Delta (sCr (última – T0) / sCr T0) das concentrações séricas de creatinina (sCr) (mg/dL) dos cães do Grupo B – SF em comparação com Grupo B – CTM. São Paulo, 2019.

A avaliação da função renal pela dimetilarginina simétrica (SDMA) também demonstrou que os valores médios do Grupo B – CTM (M1: $47,0 \pm 14,38$; M5: $44,67 \pm 16,92$) foram superiores aos do Grupo B – SF (M1: $28,29 \pm 18,3$; M5: $26,33 \pm 3,05$) ($P < 0,0001$) (Gráfico 13), no entanto em média, ambos reduziram as concentrações de SDMA ao final do período. A observação do gráfico obtido pelo cálculo dos deltas de SDMA para os dois subgrupos demonstra que a variação dos resultados entre os momentos finais e iniciais no Grupo B – CTM foi discretamente menor que no Grupo B – SF, embora não haja diferença entre os deltas dos subgrupos ($P = 0,7640$) (Gráfico 14).

Gráfico 13 - Variação média ($\pm$ DP) das concentrações séricas de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$) dos cães do Grupo B – SF em comparação com Grupo B – CTM, durante período de estudo (M1 – M5). São Paulo, 2019.

Legenda: SDMA: dimetilarginina simétrica; SF: solução fisiológica (grupo placebo); CTM: células-tronco mesenquimais; M1 a M5: momentos de avaliação a cada 3 meses ($\pm$ 20 dias).

Gráfico 14 - Delta (SDMA (último – T0) / SDMA T0) das concentrações séricas de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$) dos cães do Grupo B – SF em comparação com Grupo B – CTM. São Paulo, 2019.

As médias das concentrações de ureia (sU) em cada tempo do estudo foram maiores desde o início no Grupo B – CTM em relação ao Grupo B – SF ($P < 0,0001$). Comparando as médias $\pm$ DP de T12 com T0 de cada subgrupo, ambos apresentaram um aumento entre os tempos (Grupo B – SF: T0 = $144,4 \pm 78,0$

mg/dL; T12 = $177,6 \pm 92,2$ mg/dL e Grupo B – CTM: T0 = $211,3 \pm 73,6$ mg/dL; T12 = $264,2 \pm 75,8$ mg/dL) (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Variação média ($\pm$ DP) das concentrações séricas de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo B – SF em comparação com Grupo B – CTM, durante período de estudo (T0 – T12). São Paulo, 2019.

Legenda: SF: solução fisiológica (grupo placebo); CTM: células-tronco mesenquimais.

A comparação dos deltas obtidos para os dois subgrupos demonstrou que o aumento das concentrações séricas de ureia entre os tempos finais e T0 do Grupo B – CTM foi discretamente menor em relação ao Grupo B – SF, porém não houve diferença estatística para essa comparação ($P = 0,6126$) (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Delta (sU (último – T0) / sU T0) das concentrações séricas de ureia (sU) (mg/dL) dos cães do Grupo B – SF em comparação com Grupo B – CTM. São Paulo, 2019.

Os gráficos 17 e 18, a seguir, demonstram a correlação entre as mensurações de creatinina sérica (sCr) e dimetilarginina simétrica (SDMA), levando-se em conta os dois grupos de estudo e o grupo controle, respectivamente. Os gráficos 19, 20, 21 e 22 apresentam respectivamente, as curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier) para os estágios da DRC conforme classificação pela sCr, para as faixas de SDMA, para a razão SDMA/sCr, bem como conforme terapia instituída.

Gráfico 17 - Coeficiente de correlação da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$) e creatinina sérica (mg/dL), dos cães do Grupo A e B (cães nos estágios 2 e 3 da DRC, segundo *IRIS*, 2016) ($r = 0,6186$; $P < 0,0001$). São Paulo – 2019.

Gráfico 18 - Coeficiente de correlação da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) ($\mu\text{g/dL}$) e creatinina sérica (mg/dL), dos cães do Grupo C (controle) ($r = 0,2440$; $P = 0,4448$). São Paulo – 2019.

Gráfico 19 - Curva de sobrevida conforme as faixas de concentrações séricas de creatinina (sCr, mg/dL), determinadas para estadiamento da DRC, segundo IRIS, 2016, dos cães incluídos nos Grupos A e B (cães nos estágios 2 e 3 da DRC). São Paulo – 2019.

Gráfico 20 - Curva de sobrevida conforme o intervalo de concentrações séricas da dimetilarginina simétrica (SDMA, $\mu\text{g/dL}$), sendo de SDMA 14 – 24 $\mu\text{g/dL}$, SDMA 25 – 44 $\mu\text{g/dL}$ e SDMA ≥ 45 $\mu\text{g/dL}$, dos cães do Grupo A e B (cães nos estágios 2 e 3 da DRC, segundo *IRIS*, 2016, pela concentração de creatinina sérica). São Paulo – 2019.

Gráfico 21 - Curva de sobrevida conforme a razão SDMA/sCr, sendo razão SDMA/sCr > 10 indicador de pior prognóstico, dos cães do Grupo A e B (cães nos estágios 2 e 3 da DRC, segundo *IRIS*, 2016). São Paulo – 2019.

Gráfico 22 - Curva de sobrevida conforme a terapia instituída sendo considerado como CTM os cães que receberam a terapia com células-tronco mesenquimais (Grupo B – CTM) e SF aqueles que receberam a terapia de manutenção conservadora (Grupo B – SF). São Paulo – 2019.

A correlação entre SDMA e sCr incluindo os valores obtidos nos dois grupos estudados, Grupo A (DRC estágio 2) e Grupo B (DRC estágio 3) foi moderada ($r = 0,6186$; $P < 0,0001$) (Gráfico 17). Porém entre os cães saudáveis do Grupo C, não houve correlação entre SDMA e sCr ($r = 0,2440$; $P = 0,4448$) (Gráfico 18).

A sobrevida dos cães avaliados foi menor quanto maior a concentração sérica de creatinina assim como de SDMA. A porcentagem cumulativa de sobrevida ao final do período T12 para os cães que se mantiveram no estágio 2 da DRC (sCr: 1,41-2,0 mg/dl) foi de 100%, para aqueles que evoluíram ou já estavam do estágio 3 (sCr: 2,1-5,0 mg/dL) foi de 25,05%, já todos os cães que evoluíram para o estágio 4 da DRC (sCr > 5,0 mg/dl) vieram a óbito até o final do período (sobrevivência de 0%) (Log-rank, $P < 0,0001$) (Gráfico 19).

Ao final do acompanhamento (momento M5), a porcentagem cumulativa de sobrevida na faixa de SDMA de 14-24 $\mu\text{g/dL}$ foi de 77,07%, na faixa de 25 – 44 $\mu\text{g/dL}$ foi de 63,34% e para SDMA ≥ 45 $\mu\text{g/dL}$ foi de apenas 11,73% (Log-rank, $P = 0,0002$) (Gráfico 20). No entanto, pela avaliação da razão SDMA/sCr, não houve diferença de sobrevida entre as duas faixas estabelecidas (Log-rank, $P = 0,8352$) (Gráfico 21).

Observando os animais do Grupo B, pois foi o grupo em que ocorreram os óbitos, não houve diferença entre as curvas de sobrevida referentes às terapias

instituídas (SF ou CTM), assim a porcentagem cumulativa para o Grupo B – SF foi 24,38% e para o Grupo B – CTM foi 11,36% (Log-rank, $P = 0,1874$) (Gráfico 22).

5.4 EFEITOS ADVERSOS À APLICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO

Cinco dos cães selecionados previamente para a inclusão no estudo apresentaram reações adversas no momento da aplicação das CTMs. Destes cinco cães, dois necessitaram ser excluídos do estudo, devido a ocorrência de reação antes que se completasse a infusão intravenosa completa da solução que estava sendo administrada. Já os outros três cães que também apresentaram reações foram mantidos em acompanhamento no estudo, pois estas ocorreram ao final da infusão, quando todo o conteúdo já havia sido administrado.

Dos cães que foram excluídos do estudo, uma cadela da raça Labrador Retriever (5 anos) apresentou episódio de convulsão tônico-clônica de curta duração após o início da aplicação da solução, associada a defecação involuntária, com recuperação espontânea. Outra cadela, da raça Golden Retriever (6 anos) apresentou reação anafilática representada por urticária, eritema e edema subcutâneo, após infusão inferior a 50% do volume total da solução. Foi interrompida a administração e aplicados por via intravenosa dexametasona (0,2 mg/kg), prometazina (0,3 mg/kg) e epinefrina (0,01 mg/kg). O conteúdo das soluções foi revelado após a decisão de se excluir estes animais do estudo.

Os cães que permaneceram em acompanhamento no estudo pertenciam ao subgrupo CTM do Grupo A (A7, A8 e A12). O animal A7 apresentou episódio de síncope, com perda de consciência e defecação involuntária, com duração curta de cinco segundos, e retomada de consciência espontânea. O animal A8 apresentou episódio de convulsão tônico-clônica, com duração de 2 minutos, associada à sialorreia, micção e defecação involuntárias, com resolução após administração intravenosa de diazepam (0,5 mg/kg). O quinto animal (A12) apresentou um episódio emético, que não persistiu, não sendo necessária aplicação de medicação.

Todos os animais foram acompanhados posteriormente, sendo que nenhum apresentou persistência das manifestações ou necessidade de cuidados em longo prazo.

6 DISCUSSÃO

As reações adversas apresentadas foram relatadas em alguns estudos anteriores que descreveram sintomas neurológicos, gastrintestinais e reações de anafilaxia. Suscita-se que após a administração intravenosa periférica das células-tronco ocorra uma aglutinação dessas células, devido à sua alta capacidade de se aderir, levando a formação de microtrombos e êmbolos, que poderiam se alojar em pequenos capilares (FURLANI et al., 2009; WU et al., 2017). Assim, haveria um comprometimento hemodinâmico nos órgãos em que estivessem ocluindo vasos, levando, por exemplo, no cérebro ao aparecimento de convulsões, no trato gastrintestinal a manifestações como vômitos, náusea, diarreia e sangramentos (LEE et al., 2010; QUIMBY et al., 2013).

A reação anafilática apresentada por um dos animais já foi relatada em estudos anteriores, devido ao uso de meio para expansão celular contendo soro fetal bovino. O soro fetal bovino é capaz de gerar respostas imunes em pacientes, a partir da primeira aplicação, levando ao surgimento de reações anafiláticas e em casos extremos a reações autoimunes (SPEES et al., 2004).

Assim, o uso de células-tronco embora tenha sua segurança comprovada, não está isento de reações adversas, devendo todas essas possibilidades serem consideradas quando da indicação de uma terapia.

Na avaliação comparativa entre SDMA e sCr, neste estudo houve uma correlação moderada entre as duas variáveis ($r = 0,6186$; $P < 0,0001$) para os Grupos A e B. Uma metanálise relatou correlações entre SDMA e creatinina sérica em humanos que variaram de $r = 0,26$ a $0,94$ ($P < 0,001$) (KIELSTEIN et al., 2006). Estudos mais recentes em cães apresentam correlações variadas ($r = 0,95$, IC 95%: $0,87 - 1,0$; $r = 0,84$, $P < 0,001$) (NABITY et al., 2015; HALL et al., 2016b).

No Grupo C de cães saudáveis, no entanto, não houve correlação entre as duas variáveis, SDMA e sCr ($r = 0,2440$; $P = 0,4448$), resultado também encontrado em outros estudos de cães saudáveis ($r = -0,06$, IC 95%: $-0,37 - 0,25$; $r = 0,36$, $P = 0,08$) (NABITY et al., 2015; LIFFMAN et al., 2018). Outros estudos, no entanto, demonstraram correlação baixa entre SDMA e sCr ($r = 0,21$, $P < 0,0001$; $r = 0,32$, $P = 0,04$) em cães saudáveis (PEDERSEN et al., 2006; HALL et al., 2015).

Os animais A2, A5 e A6 do Grupo A – SF (estágio 2 da DRC, que receberam solução fisiológica) e os animais A7, A11 e A12 do Grupo A - CTM (estágio 2 da

DRC, que receberam células-tronco mesenquimais) apresentaram valores de sCr dentro da faixa de referência para a espécie (0,7 – 1,4 mg/dL). Em três desses cães, as concentrações de sU também estavam no limite superior de referência (A2, A11 e A12), e nos demais cães estavam aumentadas (A5, A6 e A7). A avaliação de SDMA para esses cães que apresentavam concentrações séricas de creatinina ainda no valor de referência, no entanto, demonstrou que em todos os momentos as concentrações séricas de SDMA encontravam-se aumentadas e, portanto, correspondiam ao estágio 2 ou superior da DRC pela avaliação da referida variável (IRIS, 2016) e que, possivelmente, as concentrações de creatinina sérica poderiam ter sido influenciadas por diversos fatores como idade, peso corporal, massa muscular levando à sub ou superestimação da função renal. Estes cães, no entanto, apresentavam idade (2 a 16 anos), EMM (1 a 3) e ECC (5 a 9) variados, não sendo possível estabelecer um fator em comum que diretamente estivesse influenciando tais alterações. Pode-se destacar o cão A7 que apresentou na maioria dos tempos concentrações normais de sCr, embora as concentrações séricas de SDMA sempre estivessem aumentadas; esse cão A7, no entanto, era o mais idoso deste grupo (16 anos), apresentando menor peso corporal (3,2 kg) e baixo escore de massa muscular (EMM = 1/3). Assim, neste animal, as concentrações de sCr podem ter sido influenciadas tanto pelo EMM quanto pela idade, como descrito em literatura (CHEW et al., 2011; HALL et al., 2015).

Por outro lado, tais fatores parecem não interferirem na avaliação da SDMA, sugerindo ser esta mais sensível como marcador indireto da taxa de filtração glomerular (TFG) e que, portanto, poderia ser, em alguns momentos, um parâmetro mais sensível para estabelecimento e monitoração da terapia da DRC (PEDERSEN et al., 2006; HALL et al., 2015; KOPKE et al., 2018).

Embora tenha sido demonstrado que a SDMA apresenta menor variabilidade interindividual relativa à sCr, há estudo em que se questiona o intervalo de referência para a população, pois pode não ser o mais adequado para toda e qualquer população (KOPKE et al., 2018). Assim, suscitou-se em um estudo em cães da raça Greyhound sobre a necessidade de modificação dos valores de referência de SDMA para essa raça (6,3 – 19,9 µg/dL) (LIFFMAN et al., 2018). Outro estudo em gatos da raça Birmanês também identificou um intervalo de referência maior para essa raça especificamente (3,4 – 19,2 µg/dL), porém ainda com limitações devido ao baixo número de animais incluídos no estudo (PALTRINIERI et

al., 2018). Suscita-se que essas variações sejam devidas à menor TFG apresentada por essas raças, que levaria a maiores valores de sCr e SDMA, no entanto mais estudos que avaliem a TFG são necessários para confirmação (LIFFMAN et al., 2018; PALTRINIERI et al., 2018).

Alguns animais dos dois Grupos A (estágio 2) e B (estágio 3) apresentaram aumentos das concentrações de SDMA que não foram acompanhados pelo aumento das concentrações de sCr, ou que ocorreram antes das elevações de sCr.

No grupo A, dois cães (A4 – SF e A11 – CTM) iniciaram o estudo no momento M1 com concentrações de SDMA > 24 µg/dL. No animal A4, durante todo o período, esses valores permaneceram aumentados ou iguais a esse limite. No animal A11, nos momentos finais (M4 e M5) as concentrações séricas de SDMA diminuíram progressivamente. As concentrações de sCr mantiveram-se em patamares semelhantes no estágio 2 da DRC durante todo o estudo nos dois animais (A4 e A11), ambos os cães apresentavam bom EMM (2/3 e 3/3) e altos ECC (9/9 e 7/9), assim, particularmente nesses dois cães, exclui-se a possibilidade de que a mensuração de sCr esteja subestimada pelo baixo escore de massa muscular e que ainda outros fatores devem ser investigados (BRAUN; LEFEBVRE; WATSON, 2003; HALL et al., 2015).

O animal A11 (Grupo A – CTM) foi o único que apresentou essa redução progressiva da SDMA no acompanhamento sequencial, embora não houve redução das concentrações de sCr ao longo do período, essa se manteve estável desde o início. Um estudo anterior que avaliou a terapia com CTM em cães com IRA, através da avaliação da sCr, também não demonstrou redução dos valores, porém o efeito da terapia foi demonstrado pela avaliação histopatológica (LIM et al., 2016). Embora não tenha sido realizada a avaliação histopatológica, suscita-se que neste animal a CTM pode ter reduzido a taxa de progressão da DRC e que, portanto, a SDMA foi mais precoce em relação a sCr em demonstrar tal efeito.

No Grupo B, os cães B3 e B5 (SF) e B8, B11, B12 e B13 (CTM) iniciaram o acompanhamento com valores de SDMA na faixa considerada como estágio 4 da DRC (≥ 45 µg/dL). Assim, observa-se que desde o início do estudo, os cães do Grupo B - CTM já estavam mais avançados no estágio da DRC em relação ao Grupo B - SF, fator que pode ter limitado a interpretação do efeito da terapia com CTMs. O animal B3 manteve concentração de SDMA elevada no momento seguinte (M2), evoluindo a óbito logo após, no entanto, pelas concentrações de sCr, este animal

permaneceria na classificação para o estágio 3 da DRC, mas deve-se levar em consideração que estes valores podem ter sido subestimados devido ao baixo EMM (1/3), bem como pela sarcopenia decorrente da própria idade (12 anos) (CHEW et al., 2011; HALL et al., 2015; NABITY et al., 2015). Quanto ao animal B5, na avaliação subsequente (M2), a concentração de SDMA indicava o retorno ao estágio 3 e devido ao abandono da participação do referido cão no estudo, não foi possível observar o desfecho. Nos animais B8 e B11, as concentrações de sCr aumentaram somente cerca de 3 e 2 meses após o aumento da SDMA, respectivamente, enquanto os cães B12 e B13 não apresentaram aumento das concentrações de sCr até o óbito. Destes, somente o animal B13 apresentava baixo EMM e, portanto, a concentração de sCr poderia ter sido subestimada, além disso, a idade dos cães B12 e B13 era de 17 e 16 anos, respectivamente, tendo a possibilidade de ocorrer a influência da idade no valor da sCr (CHEW et al., 2011; HALL et al., 2015; NABITY et al., 2015).

Dois cães do Grupo A - SF (A1 e A3) progrediram de estágio durante o acompanhamento com base nas concentrações de sCr, sendo também acompanhada pelo aumento das concentrações de SDMA, porém no animal A3, o aumento da SDMA ocorreu aproximadamente cinco meses antes da sCr (M3 x M5). Já o animal A12 (Grupo A – CTM) apresentou aumento da sCr associada ao SDMA no momento M3 que o classificaria como pertencente ao estágio 3 da DRC, porém as concentrações séricas de creatinina não permaneceram aumentadas nos demais momentos em contraposição à persistência do aumento da SDMA nos momentos seguintes (M4 e M5).

Assim, observa-se como detectado na avaliação do coeficiente de correlação entre os dois marcadores, que foi de grau moderado nos cães com DRC, que existem discordâncias entre os valores da SDMA e sCr e que, portanto, cada uma dessas variáveis apresentam influências de diferentes fatores, o que sugere que nenhuma delas possa ser substituída uma pela outra. Há ainda que ressaltar que os estudos da SDMA em cães ainda estão em andamento e que devem suscitar investigações e questões importantes para a sua interpretação.

Ainda alguns cães do Grupo A apresentaram aumentos da concentração de SDMA (A2 – SF; A8 e A9 – CTM), não acompanhados por elevação da sCr em todo período, e todos esses animais apresentavam ECC e EMM adequados, porém eram cães de menor porte, apresentando peso corporal que variou de 4,2 – 11,6 kg. No

Grupo B, três cães progrediram para o estágio 4 em relação à avaliação pela SDMA (B9 em M4, B10 e B14 em M2) em contraposição a avaliação pela creatinina sérica em que os cães se mantiveram no estágio 3 por todo o período de estudo. Nenhum desses cães apresentavam baixo ECC ou EMM, porém eram também animais de pequeno porte, com peso variando de 2,6 a 3,7 kg. Não se pode afirmar que definitivamente o porte possa ter influenciado nas concentrações de sCr, embora tenha sido demonstrado a influência do peso sobre a sCr em cães saudáveis ($r = 0,90$, IC 95%: 0,65 – 1,0), nos cães com DRC essa influência não existiu ($r = 0,37$, IC 95%: 0,24 – 0,50) (NABITY et al., 2015).

Assim, em resumo, sete cães do Grupo A poderiam ser reclassificados no estágio 3 da DRC de acordo com o SDMA (A1, A2, A3 e A4 – SF; A8, A9 e A12 – CTM), sendo que destes, apenas os cães A1 e A3 teriam progredido de estágio também na avaliação pela sCr. Embora não seja possível afirmar esta inferência, maior número de cães do subgrupo que não foi tratado com CTMs progrediu de estágio ao final do estudo, de modo que se o número de cães em cada subgrupo fosse aumentado, talvez pudesse levar a resultados mais significativos sobre a terapia celular. Em um dos cães (A1 - SF) a SDMA aumentou concomitantemente com a sCr, em outro (A3 – SF) foi cinco meses precoce em relação à sCr, enquanto nos outros cães que evoluíram de estágio, a SDMA foi o único biomarcador que identificou progressão da DRC até o final do estudo.

Já no Grupo B, oito cães poderiam ser reclassificados como estágio 4 da DRC devido ao aumento nas concentrações da SDMA (B3 – SF; B8, B9, B10, B11, B12, B13 e B14 – CTM). Destes, apenas os cães B8 e B11 apresentaram progressão da DRC avaliada pela sCr (três e dois meses após, respectivamente), sendo que os demais permaneceram no estágio 3 pelas concentrações de creatinina sérica até o momento do óbito ou final do estudo. Assim observa-se que em ambos os subgrupos SF e CTM, a SDMA já sinalizava que a doença renal encontrava-se em estágios mais avançados em alguns animais e que poderia justificar o mau prognóstico principalmente para os cães do Grupo B – CTM.

Outros estudos conduzidos em cães e gatos, que avaliaram reduções da TFG e, portanto, progressão da DRC, também detectaram aumentos da SDMA mais precoces em relação ao aumento das concentrações de sCr. Em 17 de 21 gatos avaliados com DRC, a SDMA aumentou em média 17 meses antes da marcação pela sCr (intervalo de 1,5 – 48 meses), detectando diminuições da TFG < 30%.

Entretanto, há uma crítica nesse estudo em que a concentração de sCr considerada como referência para gatos saudáveis foi $\leq 2,1$ mg/dL, assim se concentrações menores, conforme estabelecido pela *IRIS*, 2016, fossem consideradas (sCr $\leq 1,6$ mg/dL), essa diferença temporal poderia ser menor (HALL et al., 2014).

Em cães com DRC de ocorrência natural, 17 dos 19 cães avaliados apresentaram aumento de SDMA em média 9,8 meses (2,2 - 27 meses) antes do aumento da sCr, além disso, em 10 desses cães as concentrações de sCr não aumentaram até o momento do óbito, sendo que o diagnóstico foi baseado nos achados de necropsia. Neste estudo, a SDMA detectou 49% de redução da TFG (HALL et al., 2016b).

Outro estudo em cães machos, com nefropatia hereditária ligada ao cromossomo X, a avaliação da TFG estimada pela SDMA foi demonstrada 4,8 semanas antes quando comparada a avaliação pela sCr, o que correspondeu a uma redução média de 8% (6 – 24%) na TFG. Esse intervalo foi menor neste grupo devido à rápida progressão associada a esta doença (NABITY et al., 2015).

Essa característica tardia da sCr em detectar alterações da função renal está associada aos fatores não renais como massa muscular, peso, raça e idade que influenciam sua mensuração, assim o estabelecimento de valores de referência específicos, para determinadas raças e idades, poderia beneficiar a avaliação pela sCr. Sabe-se que as concentrações de sCr superam o valor de referência quando 75% do número de néfrons foi perdido, ou quando ocorreu perda de 50 – 60% da função renal (HOKAMP; NABITY, 2016). Estudo em cães com nefropatia hereditária ligada ao cromossomo X, utilizando valor de referência para a sCr baseado na população, permitiu identificar redução média da TFG de 48% (39 – 68%) (NABITY et al., 2015).

No Grupo A – CTM, o animal A10 apresentou valor mínimo de SDMA de 12 μ g/dL, portanto dentro da faixa de cães saudáveis, sendo que este apresentou essa concentração em dois momentos (M1 e M4). Embora, pela avaliação da SDMA este animal tenha oscilado entre a faixa de referência para cães saudáveis e para estágio 2 da DRC, as concentrações de sCr sempre estiveram nestes momentos, dentro da faixa determinada para estágio 2 da DRC. No Grupo B - SF, outros quatro cães (B1, B4, B6 e B7) apresentavam SDMA abaixo da faixa considerada para o estágio 3 da DRC (25 – 44 μ g/dL) no momento M1, sendo que para os cães B6 e B7 este valor estava dentro da faixa normal (11 e 12 μ g/dL, respectivamente), já para os outros

dois cães (B1 e B4), o SDMA estava na faixa de classificação no estágio 2 (19 e 22 $\mu\text{g/dL}$). Por outro lado, as concentrações de sCr desses cães sempre estiveram dentro do intervalo do estágio 3 da DRC. O cão B6 evoluiu para o estágio 2 (SDMA = 15 $\mu\text{g/dL}$) no momento M2, evoluindo posteriormente a óbito, assim nesse cão a SDMA não foi capaz de demonstrar adequadamente a redução da função renal.

O cão B7 progrediu para o estágio 3 nos momentos M2 e M3 pela avaliação da SDMA, porém nos momentos seguintes (M4 e M5), os valores de SDMA retornaram para a faixa do estágio 2. O cão B1 a partir do momento M2 já apresentou valores de SDMA esperados para o estágio 3, condizendo com o obtido pela sCr, no entanto neste animal a SDMA foi mais tardia em relação à sCr. No cão B4, os valores de SDMA aumentaram para o estágio 3 da DRC apenas nos momentos M4 e M5, embora esse cão apresentasse EMM 1/3 e fosse um animal idoso (16 anos), as concentrações de sCr neste animal identificaram mais precocemente o grau de perda da função renal.

Valores de SDMA no intervalo normal de referência associados a aumento das concentrações de sCr corresponderam a 1% de um total de mensurações realizadas em laboratórios da IDEXX (NABITY, 2018). No presente estudo, tal associação ocorreu em 18,5% (5/27) dos cães avaliados. Em um estudo em cães com insuficiência renal aguda (IRA) foi relatado que um cão com leptospirose apresentou concentrações normais de SDMA nas avaliações sequenciais, enquanto a sCr aumentou progressivamente neste indivíduo (DAHLEM et al., 2017).

Tais resultados até o momento não foram explicados ou investigados em estudos científicos, porém suscita-se a possibilidade de que possam existir fatores que influenciem as concentrações de SDMA como, por exemplo, o *clearance* hepático da SDMA que foi demonstrado em humanos (SIROEN et al., 2005). Todos os estudos realizados em cães e gatos até o momento, no entanto não evidenciaram nenhum fator que pudesse alterar as concentrações de SDMA, com exceção do estudo em cães que demonstrou diminuição dos valores de SDMA após 6 meses de introdução de dieta suplementada com L-carnitina e óleo de peixe. Neste estudo, porém esse efeito foi atribuído à melhora da função renal que, no entanto, não foi avaliada pela TFG (HALL et al., 2016a). No presente estudo, observando o sexo, peso, idade, raça, ECC e EMM dos cinco animais citados, não foi encontrado nenhum fator em comum entre eles, ao qual pudesse ser questionada ou atribuída alguma causa.

No atinente às terapias instituídas, em ambos os Grupos (A e B), não houve diferença entre a terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) ou terapia conservadora (SF). No Grupo A, as concentrações médias de sCr, SDMA e ureia entre os dois subgrupos (SF e CTM) foram próximas e não apresentaram diferenças ($P = 0,0349$; $P = 0,2222$ e $P = 0,5854$, respectivamente), embora pela avaliação da ureia houve uma redução na média ao longo do tempo, no subgrupo que recebeu a terapia com CTMs. Para o Grupo A – CTM, o delta de sCr foi discretamente menor e da SDMA foi discretamente maior em relação ao Grupo A – SF, porém o delta de sU foi menor demonstrando redução das concentrações de ureia no tempo final, entretanto esses resultados não demonstraram diferença significativa. Assim, neste estudo, a ureia sérica demonstrou uma melhor avaliação para o Grupo A em relação aos demais biomarcadores, o que afirma a necessidade da avaliação em conjunto de todos os marcadores para se obter uma análise mais completa do processo evolutivo da DRC.

A avaliação da ureia sérica neste grupo, embora não tenha sido suficiente para demonstrar o efeito da terapia celular, as diferenças entre os dois subgrupos indicam que este possa ter ocorrido no sentido de estabilizar a progressão da DRC, e que, portanto, maior número de animais ou até mesmo maior tempo de acompanhamento, poderia demonstrar de forma mais significativa tal alteração.

No Grupo B – CTM, as médias de sCr, SDMA e ureia foram ao longo de todo o estudo maiores em relação ao Grupo B – SF. Quanto aos deltas, apenas os de SDMA e sU foram discretamente menores comparados ao Grupo B – SF, embora sem diferença significativa.

Os animais randomizados para o Grupo B – CTM já apresentavam ao início do acompanhamento maiores concentrações de sCr, SDMA e sU do que o Grupo B – SF, ou seja, apresentavam estágio mais avançado da DRC, que pode ser demonstrado pela maior porcentagem de animais que evoluíram a óbito ao longo do estudo neste grupo (62,5%) em comparação ao Grupo B – SF (42,85%), assim este pode ter sido um fator que influenciou na resposta à terapia. Outro fator referente ao Grupo B foi o grande número de óbitos, impedindo o acompanhamento em longo prazo desses animais e, portanto, a evidência de mudanças associadas à terapia. No Grupo A não se observa a influência desses fatores, porém devido à tendência de alguns dos parâmetros analisados reduzirem ao longo do tempo, talvez um acompanhamento maior pudesse evidenciar tal diferença entre as terapias.

Um estudo realizado em cães utilizados como modelo experimental de indução de IRA (gentamicina + cisplatina), os quais foram separados entre um grupo de tratamento (administração na junção corticomedular renal de CTM de cordão umbilical canino) e um grupo controle (administração de solução de PBS), demonstrou redução significativa dos valores de sCr e sU no grupo tratado em relação ao grupo controle, bem como menor variação entre o tempo final e inicial de acompanhamento (LEE et al., 2017).

Entretanto, similar ao resultado do presente estudo, outros pesquisadores não encontraram nenhuma variação desses parâmetros de função renal em cães, que também foram induzidos à IRA (administração de gentamicina) e receberam terapia com CTM de medula-óssea, intravenosa. Entretanto, estes cães apresentaram redução da fibrose e maior proliferação de células epiteliais tubulares, assim como menor expressão de $TNF\alpha$ e $TFG\beta$ na análise histopatológica, em relação ao grupo controle, tratado apenas com solução fisiológica (NaCl 0,9%) (LIM et al., 2016).

Uma diferença encontrada entre os dois estudos está na forma de administração das células-tronco, ou seja, infusão intravenosa, assim como em nosso estudo, ou intrarrenal. O principal fator relacionado a isso ocorre devido à incerteza de que as células infundidas sistemicamente atinjam o órgão-alvo. Estudos já demonstraram que devido ao tamanho das células e sua capacidade de se aglutinarem, estas podem ficar retidas em leitos capilares, por exemplo, nos pulmões (FURLANI et al., 2009; WU et al., 2017). Entretanto, ambos os estudos determinaram a presença das CTM infundidas no tecido renal em análise histológica *post mortem* (LIM et al., 2016; LEE et al., 2017).

No que diz respeito à avaliação da sobrevida em nosso estudo, não houve diferença entre as curvas de sobrevivência baseadas no tratamento recebido. Assim, nenhum dos biomarcadores indiretos de função renal (creatinina e SDMA) foi capaz de identificar alterações secundárias à terapia com células-tronco mesenquimais. Entretanto, houve diferença comparando-se os estágios da DRC pela avaliação da sCr, assim como pela reclassificação com a SDMA. Assim, neste estudo não apenas a sCr, mas também a SDMA demonstrou valor prognóstico, pois quanto maior a concentração sérica de SDMA, maior a porcentagem de mortalidade. Tal valor, no

entanto, é esperado devido ao conceito de que estágios mais avançados da DRC implicam pior prognóstico (FLECK et al., 2001; WAHBI et al., 2001; IRIS, 2016).

O valor prognóstico da SDMA já foi avaliado em pacientes humanos em estado crítico, principalmente apresentando sepse, e foi encontrado valor prognóstico tanto no curto prazo da internação, para aqueles pacientes em unidade de terapia intensiva, quanto na sobrevivência a longo prazo desses pacientes (KOCH et al., 2013). Entretanto, estudo realizado em cães com doenças em estado crítico não encontrou tal valor prognóstico para SDMA, bem como a concentração sérica não era mais aumentada nesses cães em relação aos cães menos gravemente acometidos (KÖSTER et al., 2018).

A razão SDMA/sCr foi primeiramente descrita em 2015 por Yerramilli et al. como fator indicativo de mau prognóstico em cães e gatos quando razão SDMA/sCr > 10 , assim SDMA/sCr ≤ 10 indicaria melhor prognóstico. Isso seria devido ao aumento desproporcional da SDMA em relação à sCr. No presente estudo ao comparar as curvas de sobrevida entre as duas razões SDMA/sCr, não foi observada diferença em porcentagem de sobrevida, ou seja, a razão SDMA/sCr não foi preditiva de prognóstico. Apenas um estudo recente avaliou também esta razão, os grupos de estudo eram formados por cães com DRC ou IRA (insuficiência renal aguda), no entanto, não foi demonstrado valor prognóstico em relação a razão SDMA/sCr (DAHLEM et al., 2017). Assim, mais estudos devem ser realizados a fim de se avaliar a real indicação ou utilização da razão SDMA/sCr.

7 CONCLUSÃO

Nas condições em que o presente estudo foi realizado, conclui-se que:

- a terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) não é inócua, podendo levar a reações adversas na dependência da variação individual, devendo este fato ser considerado na indicação de seu uso;

- SDMA e sCr apresentaram correlação moderada, sendo que este fato pode estar relacionado a fatores extrarrenais que possam ter influenciado as concentrações de sCr, pois em alguns momentos, o aumento das concentrações da SDMA não acompanharam as concentrações de sCr;

- não foi possível evidenciar, pelos marcadores analisados, diferenças entre as terapias, conservadora e celular; talvez a influência do tempo de acompanhamento e da seleção randomizada dos cães com DRC possa ter influenciado tal avaliação;

REFERÊNCIAS

AZANDEH, S.; ORAZIZADEH, M.; HASHEMITABAR, M.; KHODADADI, A.; SHAYESTEH, A. A.; NEJAD, D. B.; GHARRAVI, A. M.; ALLAHBAKHSI, E. Mixed enzymatic-explant protocol for isolation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and encapsulation in 3D culture system. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 5, n. 10, p. 580–586, 2012. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/jbise.2012.510071>>.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 301–316, 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x>>.

BALDWIN, K.; BARTGES, J.; BUFFINGTON, T.; FREEMAN, L. M.; GRABOW, M.; LEGRED, J.; OSTWALD JR., D. AAHA Nutritional Assessment Guidelines for Dogs and Cats Special Report. **Journal of the American Hospital Association**, v. 46, p. 285–296, 2010.

BARTGES, J. W. Chronic Kidney Disease in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 42, n. 4, p. 669–692, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.04.008>>.

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. A r r r A r. **J Bras Nefrol**, v. 33, p. 93–108, 2011.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89–95.

BÖGER, R. H. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the “L-arginine paradox” and acts as a novel cardiovascular risk factor. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 10 Suppl, p. 2842S–2847S, 2004.

BÖGER, R. H.; BODE-BÖGER, S. M.; SZUBA, A.; TSAO, P. S.; CHAN, J. R.; TANGPHAO, O.; BLASCHKE, T. F.; COOKE, J. P. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk factor for endothelial dysfunction: Its role in hypercholesterolemia. **Circulation**, v. 98, n. 18, p. 1842–1847, 1998.

BRAFF, J.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; ELLIOTT, J.; YERRAMILLI, M. Relationship between Serum Symmetric Dimethylarginine Concentration and Glomerular Filtration Rate in Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 6, p. 1699–1701, 2014.

BRAUN, J. P.; LEFEBVRE, H. P.; WATSON, a D. J. Creatinine in the dog: a review. **Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, v. 32, n. 4, p. 162–179, 2003.

BRICKER, N. S.; MORRIN, P. A.; KIME, S. W. The pathologic physiology of chronic Bright's disease. An exposition of the “intact nephron hypothesis”.

Journal of the American Society of Nephrology, v. 8, n. 9, p. 1470–6, 1997.
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9294841>>.

BRODIE, J. C.; HUMES, H. D. Stem Cell Approaches for the Treatment of Renal Failure. v. 57, n. 3, p. 299–313, 2005.

BROWN, S.; ATKINS, C.; BAGLEY, R.; CARR, A.; COWGILL, L.; DAVIDSON, M.; EGNER, B.; ELLIOTT, J.; HENIK, R.; LABATO, M.; LITTMAN, M.; POLZIN, D.; ROSS, L.; SNYDER, P.; STEPIEN, R.; KIDD, J. R.; MILLER, M.; TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K.; DAS, R.; DO, C.; SAUNDERS, A. B. Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 42, n. 4, p. 542–558, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.04.005>><<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.04.009>><<http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03005.x>>.

CAPCHA, J. M. C. Avaliação de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano em lesão de órgãos e disfunção endotelial na sepse. 2015.

CAVAGLIERI, R. C.; MARTINI, D.; SOGAYAR, M. C.; NORONHA, I. L. Mesenchymal Stem Cells Delivered at the Subcapsule of the Kidney Ameliorate Renal Disease in the Rat Remnant Kidney Model. **Transplantation Proceedings**, v. 41, n. 3, p. 947–951, 2009.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S.P.; SCHENCK, P. Clinical evaluation of the urinary tract. In: CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S.P.; SCHENCK, P. **Canine and feline nephrology and urology**. 2.ed.St. Louis, Missouri: ELSEVIER, 2011. p. 32-62.

CHOI, S.; PARK, M.; KIM, J.; HWANG, S.; PARK, S.; LEE, Y. The Role of Mesenchymal Stem Cells in the Functional Improvement of Chronic Renal Failure. v. 18, n. 3, 2009.

COBRIN, A. R.; BLOIS, S. L.; KRUTH, S. A.; ABRAMS-OGG, A. C. G.; DEWEY, C. Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 54, n. 12, p. 647–655, 2013.

CÓNDOR, J. M.; RODRIGUES, C. E.; MOREIRA, R. de S.; CANALE, D.; VOLPINI, R. A.; SHIMIZU, M. H. M.; CAMARA, N. O. S.; NORONHA, I. L.; ANDRADE, L. Treatment With Human Wharton ' s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuates Sepsis-Induced Kidney Injury , Liver Injury , and Endothelial Dysfunction. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 5, p. 1048–1057, 2016.

DAHLEM, D. P.; NEIGER, R.; SCHWEIGHAUSER, A.; FRANCEY, T.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; STEINBACH, S. M. L. L. Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 3, p. 799–804, 2017.

ELLIOTT, J. Staging chronic kidney disease. In: ELLIOTT, J.; GRAUER, G.F. **BSAVA manual of canine and feline nephrology and urology**. 2.ed. Telford Way, Waterwells: BSAVA, 2007. p. 159-166.

FLECK, C.; JANZ, A.; SCHWEITZER, F.; KARGE, E.; SCHWERTFEGER, M.; STEIN, G. G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. **Kidney International**, v. 59, n. 78, p. 14–18, 2001.

FLISER, D. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): the silent transition from an “uraemic toxin ” to a global cardiovascular risk molecule. p. 71–79, 2005.

FRANGOIANNIS, N. G. Biomarkers: hopes and challenges in the path from discovery to clinical practice. **Translational Research**, v. 159, n. 4, p. 197–204, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2012.01.023>>.

FURLANI, D.; UGURLUCAN, M.; ONG, L.; BIEBACK, K.; PITTERMANN, E.; WESTIEN, I.; WANG, W.; YEREBAKAN, C.; LI, W.; GAEBEL, R.; LI, R.; VOLLMAR, B.; STEINHOFF, G.; MA, N. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. **Microvascular Research**, v. 77, n. 3, p. 370–376, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2009.02.001>>.

GRAUER, G. F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 581–596, 2005.

GRAUER, G.F. Insuficiência renal aguda e doença renal crônica. Em: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 648-662. Tradução da 4 ed.

HALL, J. A.; MACLEAY, J.; YERRAMILLI, M. M.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M. M.; SCHIEFELBEIN, H.; PAETAU-ROBINSON, I.; JEWELL, D. E. Positive impact of nutritional interventions on serum symmetric dimethylarginine and creatinine concentrations in client-owned geriatric dogs. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–14, 2016a.

HALL, J. A.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; ALMES, K.; JEWELL, D. E. Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine in Dogs with Naturally Occurring Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 3, p. 794–802, 2016b.

HALL, J. A.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; JEWELL, D. E. Comparison of Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine as Kidney Function Biomarkers in Cats with Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 6, p. 1676–1683, 2014.

HALL, J. A.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; MELENDEZ, L. D.; JEWELL, D. E. Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 3, p. 808–814, 2015.

HALLER, M.; MULLER, W.; BINDER, H.; ESTELBERGER, W.; ARNOLD, P. Single-injection inulin clearance - a simple method for measuring glomerular filtration rate in

dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 64, p. 151–156, 1998.

HEIENE, R.; MOE, L. Pharmacokinetic aspects of measurement of glomerular filtration rate in the dog: a review. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, n. 6, p. 401–414, 1998.

HEIENE, R.; MOE, L. The Relationship between Some Plasma Clearance Methods for Estimation of Glomerular Filtration Rate in Dogs with Pyometra. p. 587–596, 1999.

HOKAMP, J. A.; NABITY, M. B. Renal biomarkers in domestic species. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 28–56, 2016.

IMASAWA, T.; UTSUNOMIYA, Y.; KAWAMURA, T.; ZHONG, Y. U.; NAGASAWA, R.; OKABE, M.; MARUYAMA, N.; HOSOYA, T.; OHNO, T. The Potential of Bone Marrow-Derived Cells to Differentiate to Glomerular Mesangial Cells. p. 1401–1409, 2001.

IRIS. IRIS Staging of CKD (modified 2015). **Novartis animal health**, n. modified, p. 1–8, 2016.

IRIS. Treatment Recommendations for CKD in Dogs (2015). **International Renal Interest Society**, n. 2015, p. 1–13, 2016.

JEPSON, R. E.; SYME, H. M.; VALLANCE, C.; ELLIOTT, J. Plasma asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, L-Arginine, and nitrite/nitrate concentrations in cats with chronic kidney disease and hypertension. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 2, p. 317–324, 2008.

KAKIMOTO, Y.; AKAZAWA, S. Isolation and Identification and hydroxylysine from Human of NG3 NG- and NG3 WG-Dimethyl- Urine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 21, p. 5751–5758, 1970.

KAMPA, N.; BOSTRÖM, I.; LORD, P.; WENNSTROM, U.; OHAGEN, P.; MARIPUU, E. Day-to-day variability in glomerular filtration rate in normal dogs by scintigraphic technique. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, v. 50, n. 1, p. 37–41, 2003.

KIELSTEIN, J. T.; SALPETER, S. R.; BODE-BOEGER, S. M.; COOKE, J. P.; FLISER, D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function - A meta-analysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, n. 9, p. 2446–2451, 2006.

KOCH, A.; WEISKIRCHEN, R.; BRUENSING, J.; DÜCKERS, H.; BUENDGENS, L.; KUNZE, J.; MATTHES, M.; LUEDDE, T.; TRAUTWEIN, C.; TACKE, F. Regulation and Prognostic Relevance of Symmetric Dimethylarginine Serum Concentrations in Critical Illness and Sepsis. **Mediators of inflammation**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

KOPKE, M. A.; BURCHELL, R. K.; RUAUX, C. G.; BURTON, S. E.; LOPEZ-VILLALOBOS, N.; GAL, A. Variability of Symmetric Dimethylarginine in Apparently

Healthy Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 2, p. 736–742, 2018.

KÖSTER, L. S.; PEDRA, A.; FRAITES, T.; SITHOLE, F. A preliminary investigation into the prognostic relevance of symmetric dimethylarginine in critically ill dogs. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 28, n. 6, p. 527–531, 2018.

LEE, J. S.; HONG, J. M.; MOON, G. J.; LEE, P. H.; AHN, Y. H.; BANG, O. Y. A Long-Term Follow-Up Study of Intravenous Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Ischemic Stroke. **Stem Cells**, v. 28, p. 1099–1106, 2010.

LEE, S. J.; RYU, M. O.; SEO, M. S.; PARK, S. B.; AHN, J. O.; HAN, S. M.; KANG, K. S.; BHANG, D. H.; YOUN, H. Y. Mesenchymal stem cells contribute to improvement of renal function in a canine kidney injury model. **In Vivo**, v. 31, n. 6, p. 1115–1124, 2017.

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

LEES, J.E. Juvenile and familial nephropathies. In: ELLIOTT, J.; GRAUER, G.F. **BSAVA manual of canine and feline nephrology and urology**. 2.ed. Telford Way, Waterwells: BSAVA, 2007. p. 79-86.

LEIPER, J.; VALLANCE, P. Biological significance of endogenous methlarginines that inhibit nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res**, v. 43, p. 542–548, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00162-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00162-5)>.

LEFEBVRE, H.P. Renal function testing. In: BARTGES, J.; POLZIN, D.J. **Nephrology and urology of small animals**. 1.ed. Wiley-Blackwell, 2011. p. 91-93.

LEVEY, A.S. Use of glomerular filtration rate measurements to assess the progression of renal disease. **Semin Nephrol**, v. 9, p. 370-379. 1989.

LIFFMAN, R.; JOHNSTONE, T.; TENNENT-BROWN, B.; HEPWORTH, G.; COURTMAN, N. Establishment of reference intervals for serum symmetric dimethylarginine in adult nonracing Greyhounds. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 47, n. 3, p. 458–463, 2018.

LIM, C.-Y.; HAN, J.-I.; KIM, S.-G.; LEE, C.-M.; PARK, H.-M.; D, P. Evaluation of autologous bone marrow–derived mesenchymal stem cells on renal regeneration after experimentally induced acute kidney injury in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 77, n. 2, p. 208–217, 2016.

MACDOUGALL, D. F.; COOK, T.; STEWARD, A. P.; CATTELL, V. Canine chronic renal disease: Prevalence and types of glomerulonephritis in the dog. **Kidney International**, v. 29, n. 6, p. 1144–1151, 1986.

MARESCAU, B.; NAGELS, G.; POSSEMIERS, I.; BROE, M. E. De; BECAUS, I.; BILLIOUW, J.; LORNOY, W.; DEYN, P. P. De. Guanidino Compounds in Serum and

Urine of Nondialyzed Patients With Chronic Renal Insufficiency. **Metabolism**, v. 46, n. 9, p. 1024–1031, 1997.

MAZHARI, R.; HARE, J. M. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: Potential influences on the cardiac stem cell niche. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 4, n. SUPPL. 1, p. 21–26, 2007.

MOE, L.; HEIENE, R. Estimation of glomerular filtration rate in dogs with 99M-Tc-DTPA and iohexol. p. 138–143, 1995.

MOLLURA, D. J.; HARE, J. M.; RABB, H. Stem-cell therapy for renal diseases. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 42, n. 5, p. 891–905, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajkd.2003.07.018>>.

MORIGI, M.; BENIGNI, A. Mesenchymal stem cells and kidney repair. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, p. 788–793, 2013.

MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. **Cell**, v. 88, p. 287–298, 1997.

NABITY, M. B. Traditional Renal Biomarkers and New Approaches to Diagnostics. **Toxicologic Pathology**, v. 46, n. 8, p. 19262331880070, 2018. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623318800709>>.

NABITY, M. B.; LEES, G. E.; BOGGESS, M. M.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; RAKITIN, A.; AGUIAR, J.; RELFORD, R. Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 4, p. 1036–1044, 2015.

O'NEILL, D. G.; ELLIOTT, J.; CHURCH, D. B.; MCGREEVY, P. D.; THOMSON, P. C.; BRODBELT, D. C. Chronic kidney disease in dogs in UK veterinary practices: Prevalence, risk factors, and survival. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 4, p. 814–821, 2013.

PALTRINIERI, S.; GIRALDI, M.; PROLO, A.; SCARPA, P.; PISEDDE, E.; BECCATI, M.; GRAZIANI, B.; BO, S. Serum symmetric dimethylarginine and creatinine in Birman cats compared with cats of other breeds. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 20, n. 10, p. 1098612X1773406, 2018. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1098612X17734066>>.

PEDERSEN, L. G.; TARNOW, I.; OLSEN, L. H.; TEERLINK, T.; PEDERSEN, H. D. Body size, but neither age nor asymptomatic mitral regurgitation, influences plasma concentrations of dimethylarginines in dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 80, n. 3, p. 336–342, 2006.

PEIRED, A. J.; SISTI, A.; ROMAGNANI, P. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Kidney Disease : A Review of Clinical Evidence. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–22, 2016.

POLZIN, D. J. Chronic Kidney Disease in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 41, n. 1, p. 15–30, 2011a.

POLZIN, D.J. Chronic kidney disease. In: BARTGES, J.; POLZIN, D.J. **Nephrology and urology of small animals**. 1.ed. Wiley-Blackwell, 2011. p. 433-471, 2011b.

POLZIN, D. J. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n. 2, p. 205–215, 2013.

POLZIN, D.J. Chronic kidney disease. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C.; CÔTÉ, E. **Textbook of veterinary internal medicine: Diseases of the dog and the cat**. 8.ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017. p. 4693-4734, v. 2.

QUIMBY, J. M. Stem Cell Therapy. **Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice**, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.10.001>>.

QUIMBY, J. M.; WEBB, T. L.; HABENICHT, L. M.; DOW, S. W. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats : results of three sequential pilot studies. 2013.

REINDERS, M. E. J.; FIBBE, W. E.; RABELINK, T. J. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, p. 17–24, 2010.

RELFORD, R.; ROBERTSON, J.; CLEMENTS, C. Symmetric Dimethylarginine: Improving the Diagnosis and Staging of Chronic Kidney Disease in Small Animals. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, 2016.

RODRIGUES, C. E.; CAPCHA, J. M. C.; BRAGANÇA, A. C. De; SANCHES, T. R.; GOUVEIA, P. Q.; OLIVEIRA, P. A. F. de; MALHEIROS, D. M. A. C.; VOLPINI, R. A.; SANTINHO, M. A. R.; SANTANA, B. A. A.; CALADO, R. do T.; NORONHA, I. de L.; ANDRADE, L. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells protect against premature renal senescence resulting from oxidative stress in rats with acute kidney injury. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 19, p. 1–17, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13287-017-0475-8>>.

SCHMIDT, R. J.; BAYLIS, C. Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. **Kidney International**, v. 58, n. 3, p. 1261–1266, 2000.

SEMEDO, P.; CORREA-COSTA, M.; CENEDEZE, M. A.; MALHEIROS, D. M. A. C.; REIS, M. A.; SHIMIZU, M. H.; SEGURO, A. C.; PACHECO-SILVA, A.; CAMARA, N. O. S. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. **Stem Cells**, v.27, p. 3063-3073, 2009.

SIROEN, M. P. C.; VAN DER SIJP, J. R. M.; TEERLINK, T.; VAN SCHAİK, C.;

NIJVELDT, R. J.; VAN LEEUWEN, P. A. M. The human liver clears both asymmetric and symmetric dimethylarginine. **Hepatology**, v. 41, n. 3, p. 559–565, 2005.

SOSNAR, M.; KOHOUT, P.; RŮŽIČKA, M.; VRBASOVÁ, L. Retrospective Study of Renal Failure in Dogs and Cats Admitted to University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno during 1999-2001. **Acta Veterinaria Brno**, v. 72, n. 4, p. 593–598, 2003.

SPEES, J. L.; GREGORY, C. A.; SINGH, H.; TUCKER, H. A.; PEISTER, A.; LYNCH, P. J.; HSU, S.; SMITH, J.; PROCKOP, D. J. Internalized Antigens Must Be Removed to Prepare Hypoimmunogenic Mesenchymal Stem Cells for Cell and Gene Therapy. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 9, n. 5, p. 747–756, 2004.

TORRES CRIGNA, A.; DANIELE, C.; GAMEZ, C.; MEDINA BALBUENA, S.; PASTENE, D. O.; NARDOZI, D.; BRENNAN, C.; YARD, B.; GRETZ, N.; BIEBACK, K. Stem/Stromal Cells for Treatment of Kidney Injuries With Focus on Preclinical Models. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. June, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2018.00179/full>>.

VIEIRA, N. M.; VALADARES, M.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; BUENO JUNIOR, C. R.; BRANDALISE, V.; ASSONI, A.; GOMES, J.; LANDINI, V.; ANDRADE, T.; CAETANO, H. V. A.; VAINZOF, M.; ZATZ, M. Cell Transplantation, v. 21, p. 1407-1417, 2012.

VON HENDY-WILLSON, V. E.; PRESSLER, B. M. An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats. **Veterinary Journal**, v. 188, n. 2, p. 156–165, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.05.006>>.

WAHBI, N.; DALTON, R. N.; TURNER, C.; DENTON, M.; ABBS, I.; SWAMINATHAN, R. Dimethylarginines in chronic renal failure. **J Clin Pathol**, v. 54, n. 6, p. 470–473, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11376022>.

WANG, Y.; CHEN, X.; CAO, W.; SHI, Y. review Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation : pathological and therapeutic implications. v. 15, n. 11, 2014.

WU, Z.; ZHANG, S.; ZHOU, L.; CAI, J.; TAN, J.; GAO, X.; ZENG, Z.; LI, D. Thromboembolism Induced by Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Infusion: A Report of Two Cases and Literature Review. **Transplantation Proceedings**, v. 49, p. 1656–1658, 2017.

YERRAMILLI, M.; FARACE, G.; QUINN, J.; YERRAMILLI, M. Kidney Disease and the Nexus of Chronic Kidney Disease and Acute Kidney Injury: The Role of Novel Biomarkers as Early and Accurate Diagnostics. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 46, n. 6, p. 961–993, 2016.

YERRAMILLI M, YERRAMILLI M, OBARE E, et al. Prognostic value of symmetric dimethylarginine (SDMA) to creatinine ratio in dogs and cats with chronic kidney disease (CKD). **J Vet Intern Med**, v.29, p.1122-1256, 2015. (abstract)

ZATZ, R. Doença/insuficiência renal crônica. Em: ZATZ, R; Co-ed. SEGURO, A.C.; MALNIC, G. **Bases fisiológicas da nefrologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 333-360.

ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M.; BUENO JR, C. R.; SECCO, M.; JAZEDJE, T.; COSTA VALADARES, M.; FUSSAE SUZUKI, M.; BARTOLINI, P.; VAINZOF, M.; ZATZ, M. Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–9, 2011.