FERNANDA CHICHARO CHACAR

**Efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais sobre o
metabolismo mineral na doença renal crônica em cães**

São Paulo

2019

FERNANDA CHICHARO CHACAR

**Efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais sobre o
metabolismo mineral na doença renal crônica em cães**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Márcia Mery Kogika

São Paulo

2019

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. 3872
FMVZ

Chacar, Fernanda Chicharo
Efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais sobre o metabolismo mineral na
doença renal crônica em cães / Fernanda Chicharo Chacar. – 2019.
139 f. : il.

Tese (Doutorado) – 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. Hiperparatireoidismo. 2. Metabolismo mineral. 3. Terapia celular. 4. Doença renal
crônica. 5. Cães. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Denise Yamashita, CRB-8/8931, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais sobre o metabolismo mineral em cães com doença renal crônica", protocolada sob o CEUA nº 3553140819 (ID 006900), sob a responsabilidade de **Márcia Mery Kogika e equipe; 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 14/08/2019.

We certify that the proposal "Effects of mesenchymal stem cell therapy on mineral metabolism in dogs with chronic kidney disease", utilizing 56 Dogs (males and females), protocol number CEUA 3553140819 (ID 006900), under the responsibility of **Márcia Mery Kogika and team; 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 08/14/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **09/2019** a **09/2021**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **HOVET/FMVZ/USP**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 15 anos**

N: **56**

Linhagem: **sem predileção racial**

Peso: **2 a 50 kg**

Local do experimento: Ambulatórios do Setor de Clínica Médica do HOVET/FMVZ/USP

São Paulo, 01 de novembro de 2019

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

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CHACAR, Fernanda Chicharo

Título: **Efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais sobre o metabolismo mineral na doença renal crônica em cães**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À Marília Chacar, ao Jorge Chacar, ao Amyr Chacar e ao Paulo Bogossian.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Marília Chacar e Jorge Chacar, e ao meu irmão, Amyr Chacar, por serem os meus alicerces; aos meus avós, Luís Chicharo e Marilda Chicharo, e Alcemir Chacar e Lourdes Chacar, meus maiores exemplos.

Ao Paulo Bogossian, por caminhar sempre ao meu lado com tamanha cumplicidade e afeição. Aproveito para agradecê-lo pela inestimável ajuda nas análises estatísticas da tese;

À minha orientadora, Profa. Dra. Marcia Mery Kogika, grande inspiração e exemplo de docente e pesquisadora. Agradeço pelo carinho com que me recebeu há alguns anos nesta casa, que é a Universidade de São Paulo, e por todos os ensinamentos, orientações e confiança;

À Profa. Dra. Lúcia Andrade, por abrir as portas do laboratório de Pesquisa Básica em Nefrologia (LIM-12, FMUSP) com tamanha generosidade, e por toda a atenção; agradeço também à Dra. Camila Rodrigues e à Dra. Thalita Rojas, por todos os ensinamentos compartilhados;

Às médicas veterinárias do Serviço de Clínica Médica do HOVET-FMVZ/USP, Andréa Andrade, Bruna Coelho, Khadine Kanayama, Denise Simões e Vera Wirth, e aos enfermeiros, Carlito dos Santos, Antônio Malaquias, Elias Gonçalves e, especialmente, Gilberto Pereira e Milton Gregório, por toda a amizade e colaboração;

Às funcionárias do Serviço de Laboratório Clínico do HOVET/FMVZ-USP, Clara Mori, Cláudia Stricagnolo, Creide Costa, Maria Helena Pelissari e Edna dos Santos, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos; em especial, à Clara Mori, pela prontidão, e pelo precioso auxílio na realização das frações de excreção de eletrólitos;

Aos amigos de pós-graduação Cinthia Martorelli, Douglas Caragelasco e Natalia Garla, pela seleção e condução dos casos, e pela execução do projeto. Agradeço ainda, por toda a amizade e ensinamentos. À Bruna Ruberti, pelo companheirismo, especialmente nestes momentos finais do doutorado;

Aos amigos de pós-graduação, Mariana Porsani, Fábio Teixeira, Caio Nogueira, Cecília Zarif, Andressa Amaral e Vivian Pedrinelli, por tornarem os meus dias mais leves;

Aos professores do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP, grandes exemplos, agradeço o auxílio em todos os momentos; em especial, agradeço ao Prof. Dr. Valdo Reche, ao Prof. Márcio Brunetto, à Profa. Denise Schwartz, à Profa. Maria Alice Della Libera, ao Prof. Wilson Fernandes e à Profa. Márcia Gomes.

À CAPES, pela bolsa auxílio;

À FAPESP pelo auxílio financeiro do Projeto Temático, Processo nº 2010/19012-0.

Ao diretor geral, Prof. Dr. Renato de Souza, ao coordenador geral de ensino, Prof. Dr. Hugo Baldan, e à diretora de desenvolvimento de ensino, Profa. Dra. Aracele Fassbinder, do Instituto Federal Sul de Minas (IFSULDEMINAS), Campus Muzambinho, pelo fundamental apoio, para a conclusão desta importante etapa profissional. Agradeço especialmente à coordenação do curso de Medicina Veterinária do IFSULDEMINAS, Campus Muzambinho; em particular, ao Prof. Dr. Délcio Bueno e ao Prof. Dr. Edivaldo Nunes, pela compreensão e incentivo; aos colegas professores, pela amizade; aos meus queridos alunos, pelo convívio e compreensão.

Aos tutores dos cães utilizados neste estudo, por permitirem a participação de seus animais.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram, os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

CHACAR, F.C. **Efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais sobre o metabolismo mineral na doença renal crônica em cães.** 2019. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A doença renal crônica (DRC) é uma afecção prevalente em cães, de caráter irreversível e de natureza progressiva. Ferramentas terapêuticas que possam retardar a progressão desta enfermidade têm sido objeto de pesquisas; dentre as novas modalidades de tratamento sob investigação, está a terapia celular. Estudos em modelos pré-clínicos de DRC demonstraram que as células-tronco mesenquimais (CTMs) exercem efeito prorregenerativo, associado à liberação de fatores antifibróticos e vasculotróficos. Diante destes resultados promissores, aventa-se a aplicabilidade das CTMs como recurso terapêutico na DRC de ocorrência natural em cães. Os distúrbios do metabolismo mineral, frequentemente associados à esta condição, constituem importantes fatores de progressão e implicam no aumento da mortalidade; recursos terapêuticos que possam retardar a DRC e, por conseguinte, o desenvolvimento destes distúrbios são de grande relevância clínica. Desta forma, a hipótese do presente estudo é que a terapia com CTMs possa atenuar o desenvolvimento dos distúrbios do metabolismo mineral em cães doentes renais crônicos, e o objetivo é avaliar os efeitos da terapia celular sobre o metabolismo mineral na doença renal crônica, nestes animais. Para tanto, foram selecionados 28 cães, nos estágios 2 (grupo A) e 3 (grupo B) da DRC (IRIS), provenientes da rotina de atendimento do Serviço de Clínica Médica do Hospital Veterinário da FMVZ/USP (HOVET/USP). Os animais foram, então, divididos em subgrupos, conforme o tratamento com solução fisiológica (A – SF, n= 6; ou B – SF, n= 7) ou células-tronco-mesenquimais (A – CTM, n= 6; ou B – CTM, n= 9), e acompanhados clinicamente por um ano, ou até o óbito. Não houve diferença entre os tratamentos para as variáveis do metabolismo mineral; entretanto, a tendência de incremento nas médias das mensurações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e $25(\text{OH})\text{D}_3$ nos grupos A – CTM e B – CTM, em comparação ao placebo, foi observada. O delta dos valores de $25(\text{OH})\text{D}_3$ apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os subgrupos A – CTM e A – SF, de modo que o grupo que recebeu a terapia celular apresentou

maiores concentrações deste metabólito. Quanto às variáveis PTH, cálcio iônico, cálcio total, fração de excreção urinária de cálcio, FGF-23, fósforo sérico e fração de excreção urinária de fósforo, não houve diferença entre os tratamentos com solução fisiológica ou células-tronco mesenquimais, nos grupos A e B. O delta dos valores de uréia e fósforo sérico tenderam a ser menores no subgrupo A – CTM, em comparação ao placebo. À análise de sobrevida, não houve diferença entre os tratamentos com terapia celular ou placebo, tanto para o grupo A, quanto para o B. Independentemente do tratamento, a proporção de sobrevida tendeu a ser menor naqueles cães doentes renais crônicos que apresentaram as determinações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 < 35 \text{ pg/mL}$. No atinente ao PTH, os cães que obtiveram valores $< 8,0 \text{ pmol/L}$ apresentaram proporções de sobrevida significativamente menores, em comparação aos demais, independente do tratamento recebido ($p < 0,0001$). A partir dos resultados obtidos no presente estudo, não é possível concluir acerca dos efeitos da terapia celular sobre o metabolismo mineral na doença renal crônica em cães, nos estágios 2 e 3; por ora, sugere-se que o tratamento com células-tronco mesenquimais possa trazer maiores benefícios para aqueles cães em estágios iniciais da DRC.

Palavras-chave: Hiperparatireoidismo. Metabolismo Mineral. Terapia celular. Doença renal crônica. Cães.

ABSTRACT

CHACAR, F.C. **The Effects of Mesenchymal Stem Cell Therapy on Chronic Kidney Disease-Mineral Disorders in dogs.** 2019. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Chronic Kidney Disease in dogs is a highly prevalent illness, which is irreversible and progressive. A variety of therapeutic approaches that aim to slow CKD progression have been investigated, including the therapy with mesenchymal stem cell (MSC). Several studies performed with preclinical models showed positive results, regarding the antifibrotic effects of MSC on experimental CKD. However, it remains to be determined the benefits of MSC in dogs with naturally occurring CKD. One of the most concerning issue in patients with CKD is the development of Mineral Disorders (MD-CKD), since it is associated with disease progression and mortality. Our hypothesis is that MSC therapy could attenuate the development of MD-CKD in dogs; our aim is to evaluate the effects of MSC therapy on mineral metabolism in dogs with CKD. We recruited 28 CKD dogs with stages 2 (group A) and 3 (group B), in accordance with IRIS criteria. All of the dogs were treated at the Clinic of the Veterinary Teaching Hospital of the University of Sao Paulo, School of Veterinary Medicine and Animal Science. The dogs were assigned to receive placebo (A – SF, n= 6; B – SF, n= 7) or MSC therapy (A – CTM, n= 6; B – CTM, n= 9), and they were then followed up during one year or until death. There was no difference between the effects of placebo or MSC therapy on mineral metabolism. A trend was note regarding the serum concentrations of 1,25(OH)₂D₃ and 25(OH)D₃, which seemed to be increased in dogs that received MSC therapy (A – CTM and B – CTM), in comparison with placebo. The delta of 25(OH)D₃ was significantly higher (p< 0,05) in dogs from the A – CTM group, in comparison with those from A – SF group. There were no differences between placebo or MSC therapy for both groups (A and B), regarding PTH, ionized calcium, total calcium, urinary fractional excretion of calcium, FGF-23, serum phosphorus and urinary fractional excretion of phosphorus. A trend was note in the delta of urea and phosphorus, which were lower in the A – CTM group, in comparison with placebo. There was no difference in the survival rates of dogs whose received placebo or MSC therapy, in both goupes (A and B). Regardless

the applied treatment, the dogs that had the lowest values of calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 < 35 \text{ pg/mL}$) showed a trend to exhibit the lowest rate of survival. Similar results were obtained in those dogs that had the lowest levels of PTH ($\text{PTH} < 8,0 \text{ pmol/L}$), whose showed the lowest survival rates ($p < 0,0001$). It is not possible to conclude the effects of MSC therapy on mineral metabolism in CKD dogs with stages 2 and 3. Our results suggest that the MSC therapy may have some benefit in the early stages of CKD in dogs.

Keywords: Hyperparathyroidism. Mineral metabolism. Mesenchymal Stem Cell Therapy. Chronic kidney disease. Dogs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regulação do transporte epitelial de cálcio mediado por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	31
Figura 2 - Via OPG – RANKL – RANK induzida pelo complexo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDRs	32
Figura 3 - Ilustração do metabolismo da vitamina D	34
Figura 4 - O Papel da dieta, PTH, calcitriol e do eixo Klotho/FGF-23 na homeostase do fósforo	36
Figura 5 - Visão Klothocêntrica dos distúrbios do metabolismo ósseo-mineral na DRC	38
Figura 6 - Consorte para recrutamento e alocação dos cães clinicamente normais e doentes renais crônicos, nos grupos de estudo.	45
Figura 7 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas dos metabólitos $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (pg/mL), $25(\text{OH})\text{D}_3$ (ng/mL) e $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ng/mL) dos grupos A e B, antes e após o tratamento com solução fisiológica (SF) ou células-tronco mesenquimais (CTM).	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição da raça, sexo, idade, peso e dieta dos cães clinicamente normais (grupo C), doentes renais crônicos no estágio 2 (grupo A), tratados com solução fisiológica (subgrupo A – SF) ou células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM), e doentes renais crônicos no estágio 3 (grupo B), tratados com solução fisiológica (subgrupo B – SF) ou células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).	52
Tabela 2 - Média $\pm$ desvio-padrão (mínimo – máximo) ou mediana (mínimo – máximo) das variáveis do metabolismo mineral, obtidas nos cães clinicamente normais (Grupo C).....	54
Tabela 3 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de creatinina (mg/dL), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).	56
Tabela 4 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de uréia (mg/dL), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).	58
Tabela 5 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de creatinina (mg/dL), nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).	60
Tabela 6 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de uréia (mg/dL), nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).	62
Tabela 7 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (pg/mL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).	64

Tabela 8 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 25(OH)D₃ (ng/mL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).66

Tabela 9 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 24,25(OH)₂D₃ (ng/mL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).68

Tabela 10 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 1,25(OH)₂D₃ (pg/mL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).70

Tabela 11 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 25(OH)D₃ (ng/mL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).72

Tabela 12 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 24,25(OH)₂D₃ (ng/mL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).74

Tabela 13 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de Paratormônio (PTH), em pmol/L, nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).....77

Tabela 14 - Mediana, mínimo e máximo das concentrações séricas de Paratormônio (PTH), em pmol/L, nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF).....79

Tabela 15 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de Paratormônio (PTH), em pmol/L, nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).....79

Tabela 16 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações sanguíneas de cálcio iônico (mmol/L), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).	84
Tabela 17 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações sanguíneas de cálcio iônico (mmol/L), nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).	86
Tabela 18 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de cálcio total (mg/dL), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).	88
Tabela 19 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de cálcio total (mg/dL), nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B – SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).	90
Tabela 20 - Média $\pm$ desvio – padrão da fração de excreção urinária de cálcio, em porcentagem (%), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (A - SF) e células-tronco mesenquimais (A – CTM).	92
Tabela 21 - Média $\pm$ desvio – padrão da fração de excreção urinária de cálcio, em porcentagem (%), nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (B - SF) e células-tronco mesenquimais (B – CTM).	94
Tabela 22 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações sanguíneas de FGF-23 (pgI/mL), nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).	99
Tabela 23 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de fósforo (mg/dL), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).	103

Tabela 24 - Valores de mediana, mínimo e máximo das concentrações séricas de fósforo (mg/dL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B – SF) e células tronco-mesenquimais (B – CTM).....105

Tabela 25 - Média $\pm$ desvio-padrão da fração de excreção urinária de fósforo (FEuP%), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).109

Tabela 26 - Média $\pm$ desvio-padrão das frações de excreção urinária de fósforo, em porcentagem (%), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).....111

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Média de creatinina sérica (mg/dL) obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.	55
Gráfico 2 - Média $\pm$ desvio–padrão da creatinina sérica (mg/dL), dos cães dos subgrupos A – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e A – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).....	56
Gráfico 3 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para a creatinina sérica (mg/dL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.....	57
Gráfico 4 - Média de uréia sérica (mg/dL) obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.	58
Gráfico 5 - Média $\pm$ desvio–padrão da uréia sérica (mg/dL), dos cães dos subgrupos A – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e A – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).....	59
Gráfico 6 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para a uréia sérica (mg/dL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.....	59
Gráfico 7 - Média de creatinina sérica (mg/dL) obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.	60
Gráfico 8 - Média $\pm$ desvio–padrão da creatinina sérica (mg/dL), dos cães dos subgrupos B – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e B – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).....	61
Gráfico 9 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para a variável creatinina sérica (mg/dL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.....	61

Gráfico 10 - Média de uréia sérica (mg/dL) obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.....	62
Gráfico 11 - Média $\pm$ desvio-padrão da uréia sérica (mg/dL), dos cães dos subgrupos B – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e B – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).....	63
Gráfico 12 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para a variável uréia sérica (mg/dL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.....	63
Gráfico 13 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 1,25(OH)2D3 (pg/mL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).	64
Gráfico 14 - Comparação entre as determinações séricas de 1,25(OH)2D3 (pg/mL) dos subgrupos A – SF e A – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.	65
Gráfico 15 - Delta dos Tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações séricas de 1,25(OH)2D3 (pg/mL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.....	65
Gráfico 16 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 25(OH)D3 (ng/mL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).	66
Gráfico 17 - Comparação entre as determinações séricas de 25(OH)D ₃ (ng/mL) dos subgrupos A – SF e A – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.	67
Gráfico 18 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações séricas de 25(OH)D3 (ng/mL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.....	67

Gráfico 19 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 24,25(OH)2D3 (ng/mL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).	68
Gráfico 20 - Comparação entre as determinações séricas de 24,25(OH)2D3 (ng/mL) dos subgrupos A – SF e A – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.	69
Gráfico 21 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações séricas de 24,25(OH)2D3 (ng/mL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.....	69
Gráfico 22 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 1,25(OH)2D3 (pg/mL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).	70
Gráfico 23 - Comparação entre as determinações séricas de 1,25(OH)2D3 (ng/mL) dos subgrupos B – SF e B – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.	71
Gráfico 24 - Delta dos Tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações séricas de 1,25(OH)2D3 (pg/mL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.....	71
Gráfico 25 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 25(OH)D3 (ng/mL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).	72
Gráfico 26 - Comparação entre as determinações séricas de 25(OH)D3 (ng/mL) dos subgrupos B – SF e B – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.	73

Gráfico 27 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações séricas de 25(OH)D3 (ng/mL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.73

Gráfico 28 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 24,25(OH)2D3 (ng/mL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).74

Gráfico 29 - Comparação entre as determinações séricas de 24,25(OH)2D3 (ng/mL) dos subgrupos B – SF e B – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.75

Gráfico 30 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações séricas de 24,25(OH)2D3 (ng/mL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.....75

Gráfico 31 - Média $\pm$ desvio-padrão dos valores da razão 24,25(OH)2D3 : 25(OH)D3 obtidos nos subgrupos A – SF e A – CTM, e B – SF e B – CTM, nos momentos pré e pós-tratamento.76

Gráfico 32 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de Paratormônio (PTH) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).77

Gráfico 33 - Comparação entre as determinações séricas de Paratormônio (PTH) dos subgrupos A – SF e A – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.78

Gráfico 34 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações séricas de PTH (pmol/L) nos subgrupos A – SF e A – CTM.78

Gráfico 35 - Valores mínimos, máximos e mediana das concentrações séricas de Paratormônio (PTH, em pmol/L) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF).80

Gráfico 36 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de Paratormônio (PTH, em pmol/L) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).....	80
Gráfico 37 - Comparação entre as determinações séricas (média $\pm$ desvio-padrão) de Paratormônio (PTH) dos subgrupos B – SF e B – CTM, no período pré-tratamento, com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.....	81
Gráfico 38 - Comparação entre as determinações séricas (mínimo – máximo e mediana) de Paratormônio (PTH) dos subgrupos B – SF e B – CTM, no período pós-tratamento, com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.....	81
Gráfico 39 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações séricas de PTH (pmol/L) nos subgrupos B – SF e B – CTM.	82
Gráfico 40 - Média das concentrações sanguíneas de cálcio iônico obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.	83
Gráfico 41 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações sanguíneas de cálcio iônico (mmol/L) nos subgrupos A – SF e A – CTM.....	84
Gráfico 42 - Média das concentrações sanguíneas de cálcio iônico obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.	85
Gráfico 43 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações sanguíneas de cálcio iônico (mmol/L) nos subgrupos B – SF e B – CTM.....	86
Gráfico 44 - Média das concentrações séricas de cálcio total obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.	87

Gráfico 45 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações séricas de cálcio total (mg/dL) nos subgrupos A – SF e A – CTM....88

Gráfico 46 - Média das concentrações séricas de cálcio total obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.89

Gráfico 47 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações séricas de cálcio total (mg/dL) nos subgrupos B – SF e B – CTM....90

Gráfico 48 - Média das frações de excreção urinária de cálcio (FEuCa; %) obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.....91

Gráfico 49 - Média $\pm$ desvio-padrão da fração de excreção urinária de cálcio, em porcentagem (%), dos cães clinicamente normais, e dos subgrupos A – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e A – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).93

Gráfico 50 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para fração de excreção urinária de cálcio (%) nos subgrupos A – SF e A – CTM.93

Gráfico 51 - Média das frações de excreção urinária de cálcio (FEuCa; %) obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.....94

Gráfico 52 - Média $\pm$ desvio-padrão da fração de excreção urinária de cálcio, em porcentagem (%), dos cães clinicamente normais, e dos subgrupos B – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e B – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).95

Gráfico 53 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para a fração de excreção urinária de cálcio (%) nos subgrupos B – SF e B – CTM.96

Gráfico 54 - Valores individuais de FGF-23 observados nos momentos pré e pós-tratamento com placebo (subgrupo A – SF; n= 4) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM; n= 2).....	97
Gráfico 55 - Valores individuais de FGF-23 (pg/mL) nos subgrupos A – SF e A – CTM, no pré e pós-tratamento, com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.	97
Gráfico 56 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para a variável FGF-23 (pg/mL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.	98
Gráfico 57 - Valores individuais de FGF-23 (pg/mL) dos cães do subgrupo B – SF, pré e pós-tratamento com solução fisiológica.	99
Gráfico 58 - Valores mínimos, máximos e mediana das determinações séricas de FGF-23 (pg/mL) nos cães do subgrupo B – CTM, antes e após o tratamento com células-tronco mesenquimais.	100
Gráfico 59 - Valores individuais de FGF-23 (pg/mL) nos subgrupos B – SF e B – CTM, antes e após o tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.	100
Gráfico 60 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para a variável FGF-23 (pg/mL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.	101
Gráfico 61 - Média das concentrações séricas de fósforo (mg/dL) obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento. ..	102
Gráfico 62 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de fósforo (mg/dL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).	103

Gráfico 63 - Comparação entre as determinações séricas de fósforo (mg/dL) dos subgrupos A – SF e A – CTM, nos períodos pré e pós tratamento, com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.	104
Gráfico 64 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações séricas de fósforo (mg/dL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.....	104
Gráfico 65 - Mediana das concentrações séricas de fósforo (mg/dL) obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento. ...	105
Gráfico 66 - Box plot das concentrações séricas de fósforo (mg/dL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).....	106
Gráfico 67 - Comparação entre as determinações séricas de fósforo (mg/dL) dos subgrupos B – SF e B – CTM, nos períodos pré e pós tratamento, com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.	106
Gráfico 68 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para as concentrações séricas de fósforo (mg/dL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.....	107
Gráfico 69 - Média das frações de excreção urinária de fósforo (FEuP; %) obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.....	108
Gráfico 70 - Média $\pm$ desvio-padrão da fração de excreção urinária de fósforo, em porcentagem (%), dos cães clinicamente normais, e dos subgrupos A – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e A – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).	109
Gráfico 71 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para a fração de excreção urinária de fósforo (%) nos subgrupos A – SF e A – CTM.	110

Gráfico 72 - Média das frações de excreção urinária de fósforo (FEuP; %) obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.....	111
Gráfico 73 - Média $\pm$ desvio–padrão da fração de excreção urinária de fósforo, em porcentagem (%), dos cães clinicamente normais, e dos subgrupos B – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e B – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).	112
Gráfico 74 - Delta dos tempos pós e pré-tratamento (Δ Tpós – Tpré) para a fração de excreção urinária de fósforo (%) nos subgrupos B – SF e B – CTM.	113
Gráfico 75 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier dos cães do subgrupo A – SF e A – CTM ao longo dos 360 dias (12 meses) de acompanhamento clínico.	114
Gráfico 76 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier dos cães do subgrupo B – SF e B – CTM ao longo dos 360 dias (12 meses) de acompanhamento clínico.	115
Gráfico 77 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier dos cães tratados com placebo ou células-tronco mesenquimais nos estágios 2 e 3 da doença renal crônica (grupos A e B), ao longo dos 360 dias (12 meses) de acompanhamento clínico.....	116
Gráfico 78 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier de acordo com os valores de quartis de 1,25(OH)2D3 observados nos cães incluídos no estudo, ao longo dos 360 dias (12 meses) de acompanhamento clínico.....	117
Gráfico 79 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier de acordo com os valores de quartis de PTH observados nos cães incluídos no estudo, ao longo dos 360 dias (12 meses) de acompanhamento clínico.....	118

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
2	REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1	METABOLISMO DO CÁLCIO: O PAPEL DO PTH E DA VITAMINA D	31
2.2	METABOLISMO DO FÓSFORO: INFLUÊNCIAS DIETÉTICAS E HORMONAIS	35
2.3	DISTÚRBIOS DO METABOLISMO ÓSSEO-MINERAL NA DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	37
2.4	TERAPIA COM CÉLULAS -TRONCO MESENQUIMAIS NAS NEFROPATIAS.....	37
3	HIPÓTESE	41
4	OBJETIVOS	42
5	MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	43
5.2	SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....	43
5.3	ACOMPANHAMENTO	45
5.4	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	46
5.5	COLHEITA DE SANGUE	46
5.5.1	Determinações séricas de PTH	47
5.5.2	Determinações séricas dos metabólitos da vitamina D₃	47
5.5.3	Determinações séricas de FGF-23.....	48
5.5.4	Determinações séricas de fósforo.....	48
5.5.5	Determinações séricas de cálcio total	48
5.5.6	Determinações sanguíneas de cálcio iônico	49
5.6	COLHEITA DE URINA	49
5.6.1	Fração de excreção urinária de cálcio e fósforo	49
5.7	ANÁLISE DOS DADOS.....	50
6	RESULTADOS	51
6.2	RESULTADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS PARA O GRUPO CLINICAMENTE NORMAL (GRUPO C).....	53
6.3	RESULTADOS DOS GRUPOS A E B: CREATININA SÉRICA E URÉIA SÉRICA.....	55
6.4	METABÓLITOS DA VITAMINA D ₃	64

6.5	PARATORMÔNIO (PTH).....	77
6.6	CÁLCIO IÔNICO.....	83
6.7	CÁLCIO TOTAL.....	87
6.8	FRAÇÃO DE EXCREÇÃO URINÁRIA DE CÁLCIO.....	91
6.9	FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 (FGF-23).....	96
6.10	FÓSFORO.....	102
6.11	FRAÇÃO DE EXCREÇÃO URINÁRIA DE FÓSFORO.....	108
6.12	ANÁLISE DE SOBREVIDA.....	114
6.12.1	Análise de sobrevida comparando-se os tratamentos.....	114
6.12.2	Análise de sobrevida para a variável 1,25(OH)2D3.....	117
6.12.3	Análise de sobrevida para a variável PTH.....	118
6.12.1	Análise de sobrevida comparando-se os tratamentos.....	114
7	DISCUSSÃO	119
8	CONCLUSÃO	129

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica é uma enfermidade prevalente em cães, de caráter irreversível e de natureza progressiva. Novas opções terapêuticas que auxiliem no retardo de sua progressão tem sido objeto de estudos, inclusive na grande área da medicina regenerativa (POLZIN, 2011; QUIMBY; BORJESSON 2018).

Dentre as modalidades de tratamento sob investigação, está a terapia celular. Resultados positivos obtidos a partir de estudos experimentais inspiraram novas pesquisas acerca do potencial regenerativo e imunomodulador das células-tronco mesenquimais (CTMs). No atinente às nefropatias, estudos *in vitro* demonstraram que as CTMs exercem efeito protetor ao favorecerem a criação de um microambiente prorregenerativo, associado à liberação de fatores mitogênicos e vasculotróficos. Diante destes resultados promissores, aventa-se a aplicabilidade das CTMs como recurso terapêutico, na doença renal crônica de ocorrência natural em cães (CANTALUPPI et al., 2013; MORIGI et al., 2016).

Dentre os possíveis efeitos benéficos a serem considerados, está o papel da terapia celular na prevenção do desenvolvimento, ou ainda, na atenuação, dos distúrbios do metabolismo mineral na doença renal crônica (DM-DRC), os quais constituem importantes fatores de progressão e implicam no aumento da mortalidade (GUTIERREZ et al. 2005; MARTIN; GONZA, 2009; FOSTER, 2016; RUDINSKY et al., 2018).

Os distúrbios do metabolismo mineral englobam as alterações clínicas, bioquímicas (relativas ao cálcio, PTH, vitamina D, fósforo e FGF-23), ósseas (relativas à remodelação, mineralização e volume ósseo) e extra-ósseas (calcificações vasculares), presentes na doença renal crônica, segundo as definições do "Kidney Disease Improving Global Outcomes" (KDIGO, 2017).

Dentre as diferentes etiologias, a ocorrência do hiperparatireoidismo renal constitui o principal distúrbio do metabolismo mineral em cães, e é associado a altas taxas de mortalidade. O espectro ósseo desta afecção, por sua vez, manifesta-se por meio da osteodistrofia fibrosa, condição esta dolorosa e limitante, e que afeta profundamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos (FOSTER, 2016; NAGODE; CHEW; PODELL, 1996; SEGEV; SHIPOV, 2016).

Diante da relevância clínica dos distúrbios do metabolismo mineral na DRC em cães, estudos que se dediquem ao tema são necessários. Desta forma, a hipótese do presente estudo é que a terapia celular possa atenuar o desenvolvimento dos distúrbios do metabolismo mineral na DRC, em cães; o objetivo é avaliar os efeitos da terapia com CTMs sobre o metabolismo mineral na DRC de ocorrência natural, nos estágios 2 e 3, nesta espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METABOLISMO DO CÁLCIO: O PAPEL DO PTH E DA VITAMINA D

A regulação do metabolismo do cálcio é complexa. A fração ionizada, os receptores sensíveis ao cálcio (CaSRs) e a calcitonina desempenham papel fundamental na homeostase do cálcio, mas os principais reguladores de seu metabolismo são o PTH e os metabólitos da vitamina D (GALVAO et al., 2013).

O PTH exerce o controle “minuto a minuto” dos níveis sanguíneos de cálcio. Este hormônio é sintetizado pelas glândulas paratireóides em resposta às baixas concentrações sanguíneas de cálcio iônico. O mecanismo molecular envolvido nesse processo é mediado pelos CaSRs, que funcionam como “sensores”. Assim, o principal papel fisiológico do PTH é aumentar as concentrações sanguíneas de cálcio, por meio da (1) absorção intestinal, (2) reabsorção renal e (3) reabsorção óssea (PEACOCK, 2010).

O PTH promove indiretamente a absorção intestinal de cálcio, ao estimular a conversão do precursor 25(OH)D₃ (calcidiol) em 1,25(OH)₂D₃ (calcitriol), por meio da enzima 1-alfa-hidroxilase. O calcitriol é a forma ativa da vitamina D₃, e promove a absorção intestinal de cálcio ao se ligar nos receptores para a vitamina D (VDRs), ativando-os (VDRA). Os VDRAs estimulam o influxo de cálcio por meio da inserção de canais específicos (TRPV6), na membrana apical dos enterócitos, seguido pelo transporte intracelular mediado pela calbindina (CaBP-D28K). Além disso, os VDRAs também promovem o efluxo de cálcio na membrana basolateral do enterócito, através da bomba Ca-ATPase (CHRISTAKOS et al., 2012b; TOKA; POLLAK; HOUILLIER, 2015).

A reabsorção renal de cálcio mediada por PTH também envolve o metabólito 1,25(OH)₂D₃. A forma ativa da vitamina D₃ atua no néfron distal de maneira semelhante, ao ligar-se nos VDRs promovendo a reabsorção de cálcio por meio da inserção dos canais TRPV5 na membrana luminal. O cálcio é então transportado no meio intracelular por meio da proteína carreadora CaBP-D28K, e a saída ocorre através da membrana basolateral pelo trocador sódio-cálcio 1 (NCX1) (MOOR; BONNY, 2016) (Figura 1).

Figura 1 - Regulação do transporte epitelial de cálcio mediado por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Fonte: DUSSO (2005).

Legenda: VDR (Receptores de vitamina D); PMCA1 (Ca-ATPase); NCX1 (Trocador Sódio-Cálcio 1); CaBP (Calbindina); TRPV6 (Receptor de potencial transitório do tipo vanilóide, subfamília VI).

Outro mecanismo de reabsorção renal de cálcio, mediado por PTH, ao longo do néfron, está relacionado à atuação deste hormônio na regulação da expressão de NHE3 no túbulo proximal, um trocador envolvido no transporte de sódio e hidrogênio. O gradiente eletroquímico gerado pelo NHE3 na membrana apical, em conjunto com a Na/K-ATPase na membrana basolateral, possibilita a reabsorção passiva de cálcio. No ramo ascendente espesso da Alça de Henle, acredita-se que o PTH atue sobre as claudinas, de modo a promover a reabsorção paracelular de cálcio (MOOR; BONNY, 2016; SATO et al., 2017).

Por fim, o PTH também exerce o seu efeito hipercalcemiante ao estimular a reabsorção óssea, de forma a promover a atividade osteoclástica, por meio da via OPG – RANKL – RANK. O RANKL (ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B), expresso na superfície das células do estroma ou osteoblastos, liga-se ao seu receptor RANK, que por sua vez é expresso na superfície dos progenitores dos osteoclastos. A ligação entre RANKL-RANK estimula a diferenciação e a ativação de osteoclastos. Por outro lado, a OPG (osteoprotegerina) liga-se ao RANKL, de modo a “bloquear” a via RANKL-RANK, e por conseguinte, a diferenciação das células

progenitoras em osteoclastos, inibindo, assim, a reabsorção óssea. (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005).

O PTH estimula a expressão de RANKL, ao passo que inibe a expressão de OPG (GOMES et al., 2008; SILVA; BILEZIKIAN, 2015). O complexo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDRs (VDRAs) também promove a osteoclastogênese em condições de hipocalcemia, ao atuar de modo similar ao PTH (Figura 2).

Figura 2 - Via OPG – RANKL – RANK induzida pelo complexo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDRs

Fonte: DUSSO (2005).

Legenda: VDR (Receptores de vitamina D); RANKL (ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B); OPG (Osteoprotegerina)

O metabolismo da vitamina D, na maioria dos mamíferos, inicia-se a partir da conversão do 7-diidrocolesterol (7-DHC) em previtamina D_3 , sob a radiação Ultravioleta solar. Entretanto, em cães, todo o conteúdo corporal de vitamina D é exclusivamente proveniente da dieta, pois estes animais não são capazes de realizar a fotossíntese da vitamina D, uma vez que há baixa disponibilidade de 7-DHC (HOW, 1995; CORBEE et al., 2015).

Após a ingestão, o colecalciferol é transportado para o fígado, por meio do sistema portal e dos vasos linfáticos intestinais. No fígado, a enzima 25-hidroxilase (CYP27A1) converte o colecalciferol em $25(\text{OH})\text{D}$ (calcidiol), que forma um complexo

com a proteína transportadora VDBP (Vitamin D-binding protein), responsável por carrear o calcidiol até os rins (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; CHRISTAKOS et al., 2012a; GALVAO et al., 2013).

Nos rins, o complexo 25(OH)D-VDBP é endocitado pelos receptores megalina-cubilina, localizados na borda em escova dos túbulos proximais. Após a internalização, a VDBP é degradada, e a molécula de 25(OH)D é liberada para, então, ser convertida em 1,25(OH)₂D₃ (calcitriol), por ação da enzima 1-alfa-hidroxilase (CYP27B1). O calcitriol é a forma ativa da vitamina D, e é transportada pela VDBP-1 até os órgãos-alvo, como intestino, osso e rim. Os efeitos de 1,25(OH)₂D₃ nestes órgãos são mediados pelos Receptores da Vitamina D (VDRs). Os VDRs, quando ativados por meio da ligação com o calcitriol, passam a ser denominados de VDRA; os VDRA promovem a absorção intestinal, e a reabsorção renal e óssea de cálcio (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; CHRISTAKOS et al., 2012a; GALVAO et al., 2013).

O calcitriol exerce o efeito de retroalimentação em sua própria síntese, promovendo assim, a autorregulação do metabolismo da vitamina D. Outros fatores podem influenciar o catabolismo dos metabólitos da vitamina D, como o Fator de Crescimento de Fibroblastos-23 (FGF-23) (CHRISTAKOS et al., 2012a) (Figura 3).

Figura 3 – Ilustração do metabolismo da vitamina D

Fonte: Adaptado de HOLICK (2007).

2.2 METABOLISMO DO FÓSFORO: INFLUÊNCIAS DIETÉTICAS E HORMONAIS

Os reguladores mais importantes do metabolismo do fósforo são a dieta, o PTH, o calcitriol e o eixo Klotho/FGF-23. Mais de 70% do fósforo proveniente de fontes externas (alimentação) é absorvida no intestino delgado, especialmente no jejuno, de modo passivo. A absorção de fósforo intestinal, por meio do transporte ativo, também ocorre, basicamente por dois mecanismos (RAZZAQUE, 2009; GALVAO et al., 2013).

O primeiro deles envolve a Na/K-ATPase, presente na membrana basolateral do enterócito, que em conjunto com o conteúdo do sódio luminal, mantém o gradiente eletroquímico favorável para a absorção do fósforo; o segundo mecanismo está relacionado à atuação dos cotransportadores sódio-fósforo do tipo 2b (NaPi-2b), presentes na membrana apical do enterócito, e que são diretamente estimulados pelo calcitriol (GALVAO et al., 2013).

Semelhantemente ao intestino, os rins também apresentam os cotransportadores sódio-fósforo, mas de diferentes subfamílias. NaPi-2a e NaPi-2c estão localizados no túbulo proximal, e sofrem tanto influência hormonal, quanto dos teores dietéticos de fósforo e de outros minerais, a exemplo do magnésio. PTH, FGF-23 e o conteúdo de fósforo proveniente da alimentação inibem a expressão de NaPi-2a, enquanto que os teores dietéticos de fósforo, magnésio e a ação da fosfatonina FGF-23 inibem a expressão de NaPi-2c, o que induz à fosfatúria (PENIDO; ALON, 2012).

O FGF-23 é uma fosfatonina, sintetizada principalmente por osteócitos, que atua junto ao cofator Klotho. Klotho, por sua vez, é uma proteína transmembrana altamente expressa nos rins, necessária para a ativação dos receptores de FGF (FGFR). Em resposta ao aumento das concentrações de fósforo no lúmen intestinal, os osteócitos sintetizam FGF-23, o qual se liga ao receptor FGFR, de modo a formar o complexo FGFR-Klotho, no túbulo distal. Uma vez que o complexo tenha sido ativado, ocorre a inibição da expressão de NaPi-2a e NaPi-2c no túbulo proximal, provavelmente por efeitos parácrinos (DONATE-CORREA et al., 2012).

O metabolismo do fósforo é regido, portanto, pela complexa interação entre o intestino, ossos e rins, entretanto, os mecanismos moleculares de comunicação

entre estes órgãos ainda não são completamente compreendidos. É curioso que o FGF-23 seja sintetizado pelo osteócito em resposta ao conteúdo luminal de fósforo no intestino, o que evidencia a estreita relação entre o osso e o intestino. Acredita-se que as partículas calcioprotéicas (CPPs) possam estar envolvidas neste processo. Estas nanopartículas circulam ligadas à fetuína A, e evitam que haja a precipitação de cristais de fosfato de cálcio no espaço extracelular, principalmente no período pós-prandial. Aventa-se a hipótese de que as CPPs poderiam sensibilizar os osteócitos, os quais responderiam com a síntese de FGF-23. O papel das CPPs na homeostase do fósforo permanece sob investigação (KURO-O, 2019) (Figura 4).

Figura 4 – O Papel da dieta, PTH, calcitriol e do eixo Klotho/FGF-23 na homeostase do fósforo

Fonte: KURO-O (2019).

2.3 DISTÚRBIOS DO METABOLISMO ÓSSEO-MINERAL NA DOENÇA RENAL CRÔNICA

Os rins desempenham papel central na regulação do metabolismo mineral, uma vez que controlam a reabsorção e a excreção urinária de cálcio e fósforo, e são responsáveis pela síntese de calcitriol, a forma ativa da vitamina D. Os rins ainda são os órgãos-alvo de atuação do PTH e do FGF-23. Além disso, é nos rins em que há a maior expressão da proteína transmembrana denominada Klotho, mais precisamente nos túbulos distais (PENIDO; ALON, 2012; GALVAO et al., 2013; KURO-O, 2013).

O estudo do Dr. Kuro-o e colaboradores, publicado em 1997, demonstrou que os camundongos *knockout* para o gene Klotho apresentavam fenótipo envelhecido, com calcificação vascular, gônadas atrofiadas e osteoporose (KURO-O et al., 1997). Mais tarde, em outro estudo, foi demonstrado que pacientes humanos em diferentes estágios da DRC apresentavam baixa imunodetecção urinária de Klotho, o que foi diretamente correlacionado à taxa de filtração glomerular dos indivíduos, ao longo da progressão da doença. Os autores concluíram naquela ocasião que a DRC é um estado permanente de deficiência de Klotho, e que esta deficiência seria o gatilho para o desenvolvimento dos distúrbios ósseo-minerais na DRC (HU et al., 2011).

De acordo com a visão Klothocêntrica, a expressão de Klotho reduz conforme a DRC progride. A perda contínua de massa renal, aliada à menor expressão do cofator Klotho, induzem resistência à ação do FGF-23, o que compromete a fosfatúria, e por conseguinte, leva à retenção fosfórica. Ocorre, então, o estímulo para a síntese persistente de FGF-23 por parte dos osteócitos, com o intuito de manter a normofosfatemia. As altas concentrações sanguíneas de FGF-23, por sua vez, promovem a degradação de calcitriol, via estímulo da enzima 24-hidroxilase, ao passo que inibem a síntese da forma ativa da vitamina D, via supressão da enzima 1-alfa-hidroxilase (BLOCK et al., 2013; GALVAO et al., 2013).

A deficiência de calcitriol, por sua vez, promove a síntese de PTH, e este estimula a produção de FGF-23. À medida que a DRC progride, há o comprometimento cada vez maior da massa renal, e mesmo diante de altas concentrações séricas de PTH e FGF-23, a fosfatúria promovida por estes dois

hormônios passa a ser insuficiente para garantir o controle dos níveis sanguíneos de fósforo, e então, ocorre a hiperfosfatemia (HU et al., 2011; BLOCK et al., 2013) (Figura 5).

Figura 5 – Visão Klothocêntrica dos distúrbios do metabolismo ósseo-mineral na DRC

Fonte: BLOCK et al (2013).

Os distúrbios do metabolismo ósseo-mineral são, portanto, uma síndrome, que engloba as alterações clínicas, bioquímicas (relativas ao cálcio, PTH, vitamina D, fósforo e FGF-23), ósseas (relativas à remodelação, mineralização e volume ósseo) e extra-ósseas (calcificações vasculares), presentes na DRC (KDIGO, 2017).

Dentre as diferentes etiologias, a ocorrência do hiperparatireoidismo renal constitui o principal distúrbio do metabolismo mineral em cães, e é associado às altas taxas de mortalidade. Desta forma, recursos terapêuticos que possam retardar a progressão da doença renal crônica e, por conseguinte, o desenvolvimento destes distúrbios são de grande valia, a exemplo da terapia celular, tópico abordado a seguir.

2.4 TERAPIA COM CÉLULAS -TRONCO MESENQUIMAIS NAS NEFROPATIAS

As células-tronco são caracterizadas pela capacidade de autorrenovação e diferenciação em diversos tipos celulares. A propriedade de autorrenovação permite que as células-tronco multipliquem-se em seu estado indiferenciado, de modo a repor a população de células, mantendo-as constantes nos tecidos. Já a particularidade de diferenciação confere às células-tronco a capacidade de originar vários tipos celulares, a depender de seu potencial de diferenciação (BYDLOWSKI et al., 2009; SHI et al., 2018).

Desta forma, as células-tronco podem ser onipotentes, quando originam uma única linhagem celular, ou multipotentes, quando são capazes de originar todos os tipos celulares, a exceção da placenta e dos anexos embrionários, peculiaridade esta reservada às células-tronco totipotentes, as quais podem diferenciar-se em células embrionárias e extraembrionárias (BYDLOWSKI et al., 2009; SHI et al., 2018).

Atualmente, as células-tronco mesenquimais (CTMs) são os tipos de células multipotentes mais estudadas. Foram inicialmente isoladas na medula óssea por Friedestein em 1960 e, desde então, já foram identificadas em outros tecidos, tais como placenta, líquido amniótico, cordão umbilical, geleia de Wharton e tecido adiposo (MORIGI; ROTA; REMUZZI, 2016).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu os seguintes critérios para definir as CTMs humanas: (1) aderência ao plástico, (2) positividade para os marcadores CD90, CD73 e CD10, e negatividade para os marcadores CD34, CD14, CD45, CD19, CD79a, CD11b e HLA-DR, e (3) diferenciação *in vitro* em linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas (DOMINICI et al., 2006; CANTALUPPI; BIANCONE; QUERCIA, 2013; MORIGI et al., 2016).

O uso terapêutico das CTMs na medicina regenerativa mostrou-se atrativo pois, além das características de autorrenovação e diferenciação, este tipo celular apresenta a capacidade de migrar para os locais de lesão tecidual, e de modular a resposta imunoinflamatória. A inibição da síntese de citocinas e da proliferação de linfócitos T, bem como a supressão da maturação das células dendríticas, e dos efeitos citotóxicos das células NK são exemplos dos efeitos imunomoduladores exercidos pelas CTMs (CANTALUPPI et al., 2013).

Os efeitos desejáveis das CTMs envolvem ainda a síntese e a secreção de moléculas bioativas que apresentam potencial prorregenerativo, as quais mostraram-se benéficas em diversos estudos experimentais de injúria renal aguda. Inicialmente, os efeitos renoprotetores foram atribuídos à capacidade de diferenciação das CTMs em células tubulares residentes, substituindo, assim, aquelas lesionadas. Entretanto, estudos subsequentes demonstraram que os benefícios obtidos a partir da terapia celular foram predominantemente resultantes da secreção parácrina/endócrina de fatores anti-apoptóticos e vasculotróficos por parte das CTMs, e não por seu efeito direto de diferenciação em células tubulares (BI et al., 2007; TÖGEL; WESTENFELDER, 2010; FANG et al., 2012; MORIGI et al., 2016).

Em estudos experimentais de doença renal crônica, a terapia com CTMs mostrou-se promissora. Em camundongos com Síndrome de Alport, o tratamento com células-tronco mesenquimais minimizou a ocorrência de fibrose intersticial, embora redução da mortalidade não tenha sido observada; em outro estudo, que utilizou modelos 5/6, a terapia com CTMs apresentou impacto positivo sobre a taxa de filtração glomerular, e atenuou a glomeruloesclerose e a fibrose intersticial; Em modelos de doença renal crônica induzida por adriamicina, o tratamento com CTMs exerceu efeito anti-apoptótico sobre os podócitos, e minimizou a ocorrência de glomeruloesclerose (CAVAGLIERI et al., 2009; CHOI et al., 2009; ZOJA et al., 2012).

Dois ensaios clínicos em felinos com doença renal crônica, publicados recentemente, demonstraram a eficácia e a segurança da aplicação de CTMs provenientes de tecido adiposo. Os efeitos da terapia celular sobre a função renal não foram conclusivos em ambos os estudos, provavelmente devido ao limitado número de animais utilizados, e ao curto tempo de acompanhamento clínico (QUIMBY et al., 2016; THOMSON et al., 2019).

Até onde sabemos, ensaios clínicos para avaliar os efeitos da terapia com CTMs em cães doentes renais crônicos, ainda não foram realizados. Diante da relevância clínica desta afecção, e de seu caráter progressivo e irreversível, o estudo de novas estratégias terapêuticas, especialmente na grande área da medicina regenerativa, faz-se necessário.

3. HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que a terapia com células-tronco mesenquimais possa atenuar o desenvolvimento dos distúrbios do metabolismo mineral na doença renal crônica, em cães.

4. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são avaliar os efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais sobre as variáveis do metabolismo mineral na doença renal crônica, nos estágios 2 e 3, em cães.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo quasi-experimental

5.2. SELEÇÃO DOS ANIMAIS

O referido projeto está vinculado ao Projeto Temático da FAPESP (processo nº 19012-0/2010), e obteve a aprovação da Comissão de Ética do Hospital Universitário da USP (Registro CEP – HU/USP: 1278/13; Plataforma Brasil: 15361613.8.0000.0076) e da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC/FM/USP, sob o protocolo nº 0003/11. O presente estudo também foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da FMVZ/USP, sob o protocolo nº 3553140819.

Foram selecionados 47 cães provenientes da rotina de atendimento do Serviço de Clínica Médica do Hospital Veterinário da FMVZ/USP (HOVET/USP), dentre os quais, 19 eram clinicamente normais ($n= 19$) e 28 com doença renal crônica, sendo 12 no estágio 2 ($n= 12$) e 16 no estágio 3 ($n= 16$), conforme diretrizes da *International Renal Interest Society* (IRIS), 2017, para o diagnóstico, estadiamento e tratamento da doença renal crônica em pequenos animais.

Todos os animais foram submetidos à avaliação clínica, à coleta de sangue e urina, e à realização do ultrassom abdominal. Foram realizados os seguintes exames laboratoriais: hemograma com contagem plaquetária, bioquímica sérica (ALT, FA, GGT, bilirrubina direta e indireta, albumina, triglicerídeos, colesterol, uréia, creatinina, fósforo e cálcio total), hemogasometria e eletrólitos, exame de urina e razão proteína:creatinina urinária. Todos os animais também foram submetidos à avaliação da pressão

arterial sistêmica, de acordo com as diretrizes do consenso do Colégio Americano de Medicina Veterinária Interna (Acierno et al, 2019).

Os critérios de inclusão no estudo, para os cães clinicamente normais, foram a presença de exame físico normal aliada à ausência de alterações nos exames complementares. Para a inclusão dos indivíduos com doença renal crônica, os seguintes critérios foram obedecidos: identificação de manifestações clínicas (ex: emagrecimento progressivo, disorexia ou anorexia, êmese, diarreia e poliúria/polidipsia); azotemia persistente, de intensidade discreta a moderada (creatinina sérica de 1,4 a 2,0 mg/dL para aqueles cães no estágio 2; creatinina sérica de 2,1 a 5,0 mg/dL para aqueles cães no estágio 3); ao exame de urina, isostenúria ou hipostenúria, cilindrúria e/ou proteinúria persistentes; prospectivas mensurações da $RPC > 0,5$; exame ultrassonográfico abdominal que visibilizasse, de modo persistente, uma ou mais, das seguintes alterações: rins diminuídos de tamanho, hiperecogênicos, com perda parcial ou completa da relação corticomedular, presença de cistos em um ou ambos os rins.

O critério de exclusão adotado foi a presença concomitante de endocrinopatias, hepatopatias, doenças neurológicas, doenças infecciosas (ex: hemoparasitose, leishmaniose ou leptospirose), insuficiência cardíaca congestiva, neoplasias, piodermites, e tratamento prévio com células-tronco.

Uma vez incluídos no estudo, os cães foram alocados em 3 grupos. Os cães clinicamente normais compuseram o grupo C ($n = 19$). Este grupo foi selecionado com o intuito de estabelecer valores de normalidade para as variáveis do metabolismo mineral avaliadas. Os cães no estágio 2 da DRC foram alocados no grupo A ($n = 12$), e subdivididos conforme o tratamento recebido com solução fisiológica (SF) ou células-tronco mesenquimais (CTM). Desta forma, os cães do grupo A foram assim distribuídos: subgrupo A – SF ($n = 6$) e subgrupo A – CTM ($n = 6$). Para aqueles no estágio 3 da DRC (grupo B; $n = 16$), o mesmo procedimento foi adotado, de modo que o subgrupo B – SF foi composto por 7 animais (B – SF, $n = 7$) e o subgrupo B – CTM por 9 animais (B – CTM, $n = 9$) (Figura 6).

Figura 6 – Consorte para recrutamento e alocação dos cães clinicamente normais e doentes renais crônicos, nos grupos de estudo.

Nota: SF (Solução Fisiológica); CTM (Células-tronco mesenquimais)

Fonte: CHACAR (2019).

5.3. ACOMPANHAMENTO

Os animais foram avaliados clinicamente, e submetidos à realização dos exames complementares no T0 (baseline). Após a realização da consulta veterinária, e coleta de sangue e urina, os animais foram tratados com placebo ou CTMs, por via intravenosa, e avaliados clinicamente, e laboratorialmente, a cada 30 a 45 dias, ao longo de 12 meses, ou até o óbito.

5.4 OBTENÇÃO DAS 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 livre e esclarecido, e assinatura do termo de ciência.

Após o descongelamento rápido, em banho-maria à 37°C, com centrifugação e ressuspensão do pellet celular em soro fisiológico, foi realizada a 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. Quanto à infusão, esta foi realizada de modo lento, em veia periférica (cefálica), no tempo T0 (baseline), do estudo.

5.5. COLHEITA DE SANGUE

Amostras de sangue das veias jugulares externas, cefálicas ou safenas, foram obtidas de modo asséptico e acondicionadas em frascos com EDTA ou heparina de lítio, para a realização de hemograma com contagem plaquetária e hemogasometria com eletrólitos, respectivamente, e em frascos com gel ativador da coagulação, para a bioquímica sérica, conforme os procedimentos de rotina do serviço de Laboratório Clínico, do HOVET/FMVZ/USP.

5.5.1 Determinações séricas de PTH

As amostras de sangue foram processadas em centrífuga refrigerada a 4°C, e os soros estocados em ultrafreezer a 80°C negativos, até a mensuração, realizada na Michigan State University, por meio da técnica de radioimunoensaio, a qual já foi previamente validada para a espécie canina. A variável PTH foi avaliada no T0 (baseline), T6 (sexto mês de acompanhamento após o baseline) e T12 (décimo segundo mês de acompanhamento após o baseline), ou, no caso daqueles cães que foram à óbito antes dos 12 meses de acompanhamento clínico, no momento imediatamente anterior ao desfecho.

5.5.2 Determinações séricas dos metabólitos da vitamina D₃

As amostras de sangue foram colhidas e acondicionadas em frascos com gel ativador da coagulação, protegidas da incidência de luz, e processadas em centrífuga refrigerada a 4°C. Após, os soros foram estocados em tubos de microcentrífuga de coloração âmbar, e mantidas sob refrigeração em ultrafreezer a 80°C negativos, para a mensuração de 1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃ e 24,25(OH)₂D₃, no laboratório Heartland Assays, Iowa, cuja metodologia de mensuração para os referidos metabólitos foi previamente validada na espécie canina. A técnica laboratorial utilizada para a determinação dos referidos metabólitos foi LC/MS. As variáveis do metabolismo da vitamina D₃ foram avaliadas no T0 (baseline), T6 (sexto mês de acompanhamento após o baseline) e T12 (décimo segundo mês de acompanhamento após o baseline), ou, no caso daqueles cães que foram à óbito antes dos 12 meses de acompanhamento clínico, no momento imediatamente anterior ao desfecho.

5.5.3 Determinações séricas de FGF-23

A dosagem sérica de FGF-23 foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA), a partir do kit FGF-23- ELISA Kit (Kainos Laboratories, Inc, Japão), previamente validado para a espécie canina (HARJES et al., 2017). As concentrações séricas de FGF-23 foram avaliadas no T0 (baseline), T6 (sexto mês de acompanhamento após o baseline) e T12 (décimo segundo mês de acompanhamento após o baseline), ou, no caso daqueles cães que foram à óbito antes dos 12 meses de acompanhamento clínico, no momento imediatamente anterior ao desfecho.

5.5.4 Determinações séricas de fósforo

A dosagem sérica de fósforo foi realizada por meio de analisador automático bioquímico (kit Phosphorus 12-200, Labtest), conforme técnica de rotina adotada pelo Laboratório Clínico do HOVET/FMVZ/USP. A variável fósforo sérico foi avaliada no T0 (baseline), e após, a cada 30 dias de acompanhamento clínico, ao longo de 12 meses, ou até o óbito.

5.5.5 Determinações séricas de cálcio total

A dosagem sérica de cálcio total foi realizada por meio de analisador automático bioquímico (Total calcium 11570, BioSystems), conforme técnica de rotina adotada pelo Laboratório Clínico do HOVET/FMVZ/USP. A variável cálcio total foi avaliada no T0 (baseline), e após, a cada 30 dias de acompanhamento clínico, ao longo de 12 meses, ou até o óbito.

5.5.6 Determinações sanguíneas de cálcio iônico

A dosagem sanguínea de cálcio iônico foi realizada por meio do método eletro-íon-seletivo (Cobas b 121, Roche), em até 30 minutos após a coleta, utilizando-se seringa de heparina de lítio (Monovette, Sarstedt), conforme técnica de rotina adotada pelo Laboratório Clínico do HOVET/FMVZ/USP. A variável cálcio iônico foi avaliada no T0 (baseline), e após, a cada 30 dias de acompanhamento clínico, ao longo de 12 meses, ou até o óbito.

5.6. COLHEITA DE URINA

Amostras de urina foram colhidas, de forma asséptica, por meio de sondagem uretral, ou cistocentese (guiada por ultrassom), após breve contenção física, para a realização de exame de urina, RPC e fração de excreção urinária de eletrólitos.

5.6.1 Fração de excreção urinária de cálcio e fósforo

Para a mensuração da fração de excreção urinária de cálcio e fósforo, utilizou-se o sobrenadante da urina, previamente estocado em ultrafreezer a 80 graus negativos. Após o descongelamento, as alíquotas de urina utilizadas para a mensuração do cálcio foram tratadas com ácido nítrico (10%; proporção de 100 microlitros de urina para 1 microlitro de ácido nítrico); aquelas destinadas à mensuração do fósforo foram tratadas conforme descrito por Martorelli, 2016 (MARTORELLI et al., 2016). O processamento das amostras foi realizado em analisador automático bioquímico (Randox Daytona, Randox).

Para o cálculo da fração de excreção urinária de eletrólitos, utilizou-se a fórmula a seguir, em que FEu(%) representa a fração de excreção urinária de eletrólitos em porcentagem (PRESSLER, 2015).

$$FEu(\%) = [(Eletrólito\ sérico \times Creatinina\ urinária) / (Eletrólito\ urinário \times Creatinina\ sérica)] \times 100$$

5.7. ANÁLISE DOS DADOS

Foi realizada a estatística descritiva dos dados (valores mínimo e máximo, a média, o desvio-padrão da média, e a mediana), para cada momento de avaliação, nos grupos A – SF e A – CTM, e B – SF e B – CTM. Também foi calculada a estatística descritiva, para estes mesmos subgrupos, considerando-se os momentos pré (baseline) e pós-tratamento (todos os tempos pós-tratamento).

Para avaliar o efeito da terapia celular ou do placebo sobre as variáveis, considerando-se o “efeito tempo” (pré x pós-tratamento), utilizou-se a comparação pareada de médias ou das medianas (Teste t de Student ou teste de Wilcoxon, respectivamente), conforme a distribuição dos dados.

Para avaliar o efeito do tratamento com CTMs ou placebo, realizou-se a comparação das médias ou das medianas, no período pós-tratamento, entre os subgrupos, utilizando-se, respectivamente, o Teste t de Student não-pareado ou Mann–Whitney.

O delta foi calculado subtraindo-se os valores obtidos no pós-tratamento daqueles obtidos no pré-tratamento, para cada indivíduo, em cada subgrupo. Após, testou-se a diferença das médias ou das medianas, entre os subgrupos, utilizando-se o Teste t de Student não-pareado ou Mann–Whitney, conforme a distribuição paramétrica ou não-paramétrica dos dados, respectivamente.

Utilizou-se a análise de sobrevida de Kaplan-Meier, em que foram contabilizados os dias de sobrevida, em dias, até o óbito ou até o final de acompanhamento do estudo. Os dados dos participantes que abandonaram o estudo, ou que foram a óbito por causas extra-renais, foram censurados.

Para todas as análises, considerou-se o nível de significância de $\alpha \leq 5\%$, e utilizou-se o software Prism (GraphPad).

6 RESULTADOS

6.1. DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Os cães clinicamente normais (grupo C; $n = 19$), 9 machos e 10 fêmeas, tinham 8 – 108; $49,47 \pm 33,51$ meses de idade, e o peso de 3,2 - 34,20; $18,26 \pm 9,05$ kg. As raças eram variadas, dentre elas, SRD (11/19), Teckel (1/19), Golden Retriever (1/19), Yorkshire (1/19), Pitbull (1/19), Bull terrier (1/19), Lhasa Apso (1/19), Labrador (1/19), e Pinscher (1/19). Quanto à dieta de base, esta era de uso comercial (manutenção), e de marcas e sabores variados.

Para compor o grupo dos cães doentes renais crônicos no estágio 2 (grupo A), submetidos ao tratamento com solução fisiológica (subgrupo A – SF; $n = 6$), foram selecionados 3 fêmeas e 3 machos, que tinham 24 – 180; $88,17 \pm 68,40$ meses de idade, e o peso de 6,6 – 42; $21,88 \pm 14,83$ kg. Buldogue Americano (1/6), Pug (1/6), Golden Retriever (1/6), Labrador Retriever (1/6), Shih tzu (1/6) e Lhasa Apso (1/6) foram as raças dos cães selecionados. Ainda no atinente ao grupo A, os cães tratados com células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM; $n = 6$), eram de gêneros (3 machos e 3 fêmeas) e raças variadas, como Poodle (2/6), SRD (2/6), Shih tzu (1/6) e Pug (1/6); a idade dos animais deste subgrupo foi de 65 – 192; $127,5 \pm 22,08$ meses, e o peso variou de 3,2 a 26,20 kg, com média de 9,43 kg, e desvio-padrão de 8,66 kg. Quanto às dietas do grupo A (DRC estágio 2), estas variaram entre caseiras hipofosfóricas, comerciais de manutenção e comerciais de prescrição para nefropatas.

Os cães doentes renais crônicos no estágio 3 (grupo B) que receberam placebo (subgrupo B – SF; $n = 7$) eram 4 machos e 3 fêmeas, tinham 24 – 192; $109,9 \pm 55,51$ meses de idade, e pesavam 3,5 – 41,50; $11,30 \pm 13,45$ kg. As raças eram variadas, dentre elas, Lhasa Apso (2/7), Shih tzu (1/7), Poodle (1/7), Yorkshire (1/7), Terrier Brasileiro (1/7) e Pastor Alemão (1/7). O subgrupo B – CTM ($n = 9$), submetido à terapia celular, foi composto por 4 machos e 5 fêmeas, e apresentaram 18 – 204; $103,4 \pm 70$ meses de idade, e o peso variou de 2,6 – 42 kg, com média de 17,42 kg, e desvio-padrão de 16,77 kg. As raças observadas neste subgrupo foram:

Yorkshire (1/9), Pinscher (1/9), Pitbull (1/9), Teckel (1/9), Visla (1/9), SRD (1/9), Poodle (1/9) e Golden Retriever (2/9). A dieta base dos animais do grupo B (DRC estágio 3) foi predominantemente comercial, de prescrição para nefropatas, porém alguns também consumiam dieta caseira hipofosfórica, conforme descrito na tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição da raça, sexo, idade, peso e dieta dos cães clinicamente normais (grupo C), doentes renais crônicos no estágio 2 (grupo A), tratados com solução fisiológica (subgrupo A – SF) ou células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM), e doentes renais crônicos no estágio 3 (grupo B), tratados com solução fisiológica (subgrupo B – SF) ou células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

Variáveis	Grupo C (n= 19)	Grupo A		Grupo B	
		SF (n= 6)	CTM (n= 6)	SF (n= 7)	CTM (n= 9)
Raça	SRD (n= 11); Teckel (n= 1); Golden Ret. (n= 1); Yorkshire (n= 1); Pitbull (n= 1); Bull terrier (n= 1); Lhasa Apso (n= 1); Labrador (n= 1); Pinscher (n= 1)	Bulldogue Americano (n= 1); Pug (n= 1); Golden Ret. (n= 1); Labrador Ret. (n= 1); Shih tzu (n= 1); Lhasa Apso (n= 1)	Poodles (n= 2); SRD (n= 2); Shih tzu (n= 1); Pug (n= 1)	Lhasa Apso (n= 2); Shih tzu (n= 1); Poodle (n= 1); Yorkshire (n= 1); Terrier Bras. (n= 1); Pastor Alemão (n= 1)	Yorkshire (n= 1); Pinscher (n= 1); Pitbull (n= 1); Teckel (n= 1); Golden Ret. (n= 2); Visla (n= 1); SRD (n= 1); Poodle (n= 1)
Sexo	M (n= 9) F (n= 10)	M (n= 3) F (n= 3)	M (n= 3) F (n= 3)	M (n= 4) F (n= 3)	M (n= 4) F (n= 5)
Idade (meses)	47 ± 33,51 (8 – 108)	88,17 ± 68,40 (24 – 180)	127,5 ± 22,08 (65 – 192)	109,9 ± 55,51 (24 – 192)	103,4 ± 70 (18 – 204)
Peso (kg)	18,26 ± 9,05 (3,2 – 34,2)	21,88 ± 14,83 (6,6 – 42)	9,43 ± 8,66 (3,2 – 26,60)	11,30 ± 13,45 (3,5 – 41,50)	17,42 ± 16,77 (2,6 – 42)
Dieta	CoMa	CoPN (n= 4) CaHP (n= 1) CoPN + CaHP (n= 1)	CoPN (n= 1) CaHP (n= 2) CoMa (n= 2) CoMs (n= 1)	CoPN (n= 6) CaHP (n= 1)	CoPN (n= 6) CaHP (n= 3)

Legenda: Idade e Peso expressos em média ± Desvio-padrão (mínimo – máximo); CoMa - Dieta comercial de manutenção para cães adultos; CoPN – Dieta de prescrição para nefropatas; CaHP – Dieta caseira hipofosfórica; CoMs – Dieta comercial de manutenção sênior; CaHP: composta por arroz, peito de frango, cenoura, chuchu, sal e óleo de girassol; CoPN: variação de proteínas de 14,0 a 14,5% e fósforo de 0,17 a 0,30% na matéria seca (MS).

6.2. RESULTADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS PARA O GRUPO CLINICAMENTE NORMAL (GRUPO C)

Os cães clinicamente normais (grupo C) apresentaram como valores de creatinina e uréia séricas (mínimo – máximo; média $\pm$ desvio-padrão), respectivamente, 0,61 – 1,14; $0,87 \pm 0,16$ mg/dL e 25,20 – 53,40; $39,36 \pm 8,4$ mg/dL.

Quanto às variáveis relativas ao metabolismo do cálcio, o grupo C apresentou as seguintes mensurações dos metabólitos da vitamina D: 35,10 – 76,70; $57,14 \pm 12$ pg/mL para a variável $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; 14,10 – 74,50; $41,12 \pm 16,24$ ng/mL de $25(\text{OH})\text{D}_3$; 6,2 – 49,50; $28,82 \pm 12,97$ ng/mL para a variável $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

O resultado das determinações do PTH dos cães deste mesmo grupo foi 0,5 – 2,2; $1,0 \pm 0,5$ pmol/L. Para o cálcio total, obteve-se 7,47 – 10,89; $9,18 \pm 0,79$ mg/dL, e 1,32 – 1,47; $1,40 \pm 0,04$ mmol/L para o cálcio iônico. Considerando-se a fração de excreção urinária de cálcio, observou-se 0,06 – 1,37; $0,35 \pm 0,39$ %.

No atinente aos valores séricos de FGF-23 encontrados nos cães do grupo C, estes foram de 144,6 – 422,7; $263,4 \pm 79,68$ pg/mL; quanto ao fósforo sérico, obteve-se 1,49 – 5,7; $3,25 \pm 1,30$ mg/dL, e para a fração de excreção urinária de fósforo, os resultados foram (mínimo – máximo; mediana) de 0,9 a 67,60; 10,15% (Tabela 2).

Tabela 2 - Média $\pm$ desvio-padrão (mínimo – máximo) ou mediana (mínimo – máximo) das variáveis do metabolismo mineral, obtidas nos cães clinicamente normais (Grupo C).

Variáveis	Grupo C
1,25(OH)2D3 (pg/mL)	57,14 $\pm$ 12 (35,10 – 76,70)
25(OH)D3 (ng/mL)	41,12 $\pm$ 16,24 (14,10 – 74,50)
24,25(OH)2D3 (ng/mL)	28,82 $\pm$ 12,97 (6,2 – 49,50)
PTH (pmol/L)	1,0 $\pm$ 0,5 (0,5 – 2,2)
Cálcio total (mg/dL)	9,18 $\pm$ 0,79 (7,47 – 10,89)
Cálcio iônico (mmol/L)	1,40 $\pm$ 0,04 (1,32 – 1,47)
FEuCa (%)	0,35 $\pm$ 0,39 (0,06 – 1,37)
FGF-23 (pg/mL)	263,4 $\pm$ 79,68 (144,6 – 422,7)
Fósforo sérico (mg/dL)	3,25 $\pm$ 1,30 (1,49 – 5,7)
FEuP (%)	10,15 (0,9 - 67)
Creatinina sérica (mg/dL)	0,87 $\pm$ 0,16 (0,61 – 1,14)
Uréia sérica (mg/dL)	39,36 $\pm$ 8,4 (25,20 – 53,40)

Legenda: FGF-23 – *Fibroblast Growth Factor 23*; PTH – Paratormônio; FEuCa – Fração de Excreção de Cálcio; FEuP – Fração de Excreção de fósforo

6.3. RESULTADOS DOS GRUPOS A E B: CREATININA SÉRICA E URÉIA SÉRICA

6.3.1 Grupo A

A variável creatinina sérica foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos, A – SF e A – CTM, conforme demonstrado no gráfico a seguir (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Média de creatinina sérica (mg/dL) obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

No subgrupo A – SF, observou-se 1,5 – 2,0; $1,65 \pm 0,18$ mg/dL no baseline, e 1,1 – 2,8; $1,73 \pm 0,32$ mg/dL após o tratamento com solução fisiológica. No subgrupo A – CTM, observou-se 1,30 – 1,73; $1,55 \pm 0,15$ como determinações de creatinina sérica antes, e 0,90 – 2,30; $1,64 \pm 0,31$ mg/dL após a terapia celular (Tabela 3).

Tabela 3 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de creatinina (mg/dL), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

	A – SF	A – CTM
Pré – tratamento	$1,65 \pm 0,18$	$1,55 \pm 0,15$
Pós – tratamento	$1,73 \pm 0,32$	$1,64 \pm 0,31$

Considerando-se os momentos de avaliação, não houve diferença nos valores de creatinina sérica no pré e pós-tratamento, tanto para o subgrupo A – SF, quanto para o subgrupo A – CTM. Comparando-se os tratamentos, também não foram observadas diferenças entre as médias desta variável no baseline e após a intervenção (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Média $\pm$ desvio-padrão da creatinina sérica (mg/dL), dos cães dos subgrupos A – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e A – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).

À análise do delta da creatinina sérica (valores obtidos no pós-tratamento subtraídos daqueles observados no pré-tratamento), não foi verificada diferença nas médias entre os subgrupos A – SF e A – CTM (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para a creatinina sérica (mg/dL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.

A variável uréia sérica foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos, A – SF e A – CTM, conforme demonstrado no gráfico a seguir (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Média de uréia sérica (mg/dL) obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

Para esta mesma variável, os resultados observados no subgrupo A – SF foram 39,80 – 68,50; $58,60 \pm 10,78$ mg/dL e 32,70 – 194,0; $70,0 \pm 26,76$ mg/dL, nos momentos pré e pós-tratamento com placebo, respectivamente. No subgrupo A – CTM, verificou-se os valores de 28,10 – 134,6; $74,30 \pm 39,80$ mg/dL de uréia sérica antes da terapia celular, e 17,40 – 160,5; $71,0 \pm 35,52$ mg/dL após (Tabela 4).

Tabela 4 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de uréia (mg/dL), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

	A – SF	A – CTM
Pré – tratamento	$58,60 \pm 10,78$	$74,30 \pm 39,80$
Pós – tratamento	$70,0 \pm 26,76$	$71,0 \pm 35,52$

Contrapondo-se os momentos pré e pós-tratamento, não houve diferença nas determinações de uréia sérica, tanto para o subgrupo A – SF, quanto para o subgrupo A – CTM. Entre os tratamentos, também não verificou-se diferença nos valores da referida variável no baseline, e após a intervenção (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Média $\pm$ desvio-padrão da uréia sérica (mg/dL), dos cães dos subgrupos A – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e A – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).

Quanto ao delta, não identificou-se diferença entre os subgrupos A – SF e A – CTM para a variável uréia sérica; entretanto, os cães que receberam terapia celular apresentaram valores consideravelmente menores em comparação àqueles que receberam placebo (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para a uréia sérica (mg/dL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.

6.3.2 Grupo B

A variável creatinina sérica foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos, B – SF e B – CTM, conforme demonstrado no gráfico a seguir (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Média de creatinina sérica (mg/dL) obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

No subgrupo B – SF, obteve-se 2,4 – 2,8; $2,53 \pm 0,17$ mg/dL, antes do placebo, e 1,80 – 4,10; $2,84 \pm 0,51$ mg/dL após. No subgrupo tratado com células-tronco mesenquimais (B – CTM), os resultados da creatinina sérica foram 2,10 – 4,7; $3,17 \pm 1,0$ mg/dL antes, e 1,80 – 12,90; $3,67 \pm 1,70$ mg/dL após a terapia celular (Tabela 5).

Tabela 5 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de creatinina (mg/dL), nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

	B – SF	B – CTM
Pré – tratamento	$2,53 \pm 0,17$	$3,17 \pm 1,0^a$
Pós – tratamento	$2,84 \pm 0,51$	$3,67 \pm 1,70^b$

Legenda: a,b ($p < 0,05$)

Comparativamente, os valores de creatinina sérica nos momentos pré e pós-tratamento não diferiram no subgrupo B – SF, o qual recebeu placebo. Já no subgrupo B – CTM, observou-se aumento significativo das concentrações desta variável entre os momentos baseline e pós-terapia celular ($p < 0,05$). Entre os subgrupos, não houve diferença entre as médias de creatinina, tanto no pré, quanto após a intervenção (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Média $\pm$ desvio-padrão da creatinina sérica (mg/dL), dos cães dos subgrupos B – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e B – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).

À análise do delta, não houve diferença entre os subgrupos B – SF e B – CTM para a variável creatinina sérica, embora, visualmente, os valores tenham sido maiores neste último subgrupo (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para a variável creatinina sérica (mg/dL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.

No atinente às determinações séricas de uréia, esta foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos, B – SF e B – CTM, conforme demonstrado no gráfico a seguir (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Média de uréia sérica (mg/dL) obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

No subgrupo B – SF, verificou-se 63 – 271,1; $144,4 \pm 78,04$ mg/dL no baseline, e 70,53 – 321,8; $164,4 \pm 85,81$ mg/dL após o placebo. No subgrupo B – CTM, os resultados observados para esta mesma variável foram 45,8 – 318,8; $193 \pm 88,20$ mg/dL antes da terapia celular, e 45,0 – 456; $214,7 \pm 91,56$ mg/dL após (Tabela 6).

Tabela 6 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de uréia (mg/dL), nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

	B – SF	B – CTM
Pré – tratamento	$144,4 \pm 78,04$	$193 \pm 88,20$
Pós – tratamento	$164,4 \pm 85,81$	$214,7 \pm 91,56$

Não houve diferença nas mensurações séricas de uréia entre os momentos pré e pós-tratamento, para ambos os subgrupos. Comparando-se os tratamentos, também não foi verificada diferença nas médias da variável supracitada entre os subgrupos B – SF e B – CTM, os quais receberam, respectivamente, placebo e células-tronco mesenquimais, nos momentos de avaliação (pré x pós) (Gráfico 11).

Gráfico 11 – Média $\pm$ desvio-padrão da uréia sérica (mg/dL), dos cães dos subgrupos B – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e B – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).

No tocante ao delta, não houve diferença entre os subgrupos B – SF e B – CTM para a variável uréia sérica (Gráfico 12).

Gráfico 12 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para a variável uréia sérica (mg/dL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.

6.4. METABÓLITOS DA VITAMINA D₃

6.4.1 Grupo A

No atinente ao subgrupo A – SF, o resultado observado para 1,25(OH)₂D₃ foi de 25,0 – 90,7; 62,88 ± 27,95 pg/mL no *baseline*, e de 35,62 – 88,17; 62,78 ± 23 pg/mL após o tratamento. Os cães do subgrupo A – CTM apresentaram 16,1 – 58,10; 39,22 ± 14,49 pg/mL de 1,25(OH)₂D₃ no *baseline*, e 28,55 – 70,53 pg/mL; 48,72 ± 14,60 pg/mL após a terapia celular (Tabela 7).

Tabela 7 – Média ± desvio-padrão das concentrações séricas de 1,25(OH)₂D₃ (pg/mL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

	A – SF	A – CTM
Pré – tratamento	62,88 ± 27,95	39,22 ± 14,49
Pós – tratamento	62,78 ± 23	48,72 ± 14,60

Comparando-se os momentos de avaliação, não foi observada diferença entre o pré e pós-tratamento no subgrupo A – SF e A – CTM, conforme representado no gráfico abaixo (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Média ± desvio-padrão das concentrações séricas de 1,25(OH)₂D₃ (pg/mL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

Entre os tratamentos, também não houve diferença nas mensurações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no baseline e após a intervenção (Gráfico 14).

Gráfico 14 – Comparação entre as determinações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (pg/mL) dos subgrupos A – SF e A – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

À avaliação do delta (valores obtidos no pós-tratamento subtraídos dos valores obtidos no pré-tratamento), não foi verificada diferença nas mensurações da variável em questão entre os subgrupos A – SF e A – CTM (Gráfico 15).

Gráfico 15 – Delta dos Tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (pg/mL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.

No que se refere a variável 25(OH)D₃, o resultado para subgrupo A – SF foi de 15,80 – 126,30; 62,87 ± 37,0 ng/mL antes, e 10 – 97,80; 55,13 ± 28,77 ng/mL após o tratamento com solução fisiológica. Os cães do subgrupo A – CTM apresentaram 8,7 – 49,20; 33,20 ± 18,11 ng/mL de 25(OH)D₃ no *baseline*, e 8,2 79,3; 45,86 ± 29,89 ng/mL após a terapia celular (Tabela 8).

Tabela 8 – Média ± desvio-padrão das concentrações séricas de 25(OH)D₃ (ng/mL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

	A – SF	A – CTM
Pré – tratamento	62,87 ± 37,0	33,20 ± 18,11
Pós – tratamento	55,13 ± 28,77	45,86 ± 29,89

No subgrupo A – SF, não houve diferença entre as médias dos valores séricos de 25(OH)D₃ antes e após o placebo. No subgrupo A – CTM, também não se observou diferença entre o período pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais, conforme representado no gráfico a seguir (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Média ± desvio-padrão das concentrações séricas de 25(OH)D₃ (ng/mL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

No tocante aos subgrupos A – SF e A – CTM, não houve diferença entre eles antes e após a intervenção, para a variável 25(OH)D₃ (Gráfico 17).

Gráfico 17 – Comparação entre as determinações séricas de 25(OH)D₃ (ng/mL) dos subgrupos A – SF e A – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

Considerando-se o delta das concentrações séricas de 25(OH)D₃, os valores observados no subgrupo A – CTM foram significativamente maiores ($p=0,03$) do que aqueles obtidos no subgrupo A – SF (Gráfico 18).

Gráfico 18 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações séricas de 25(OH)D₃ (ng/mL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.

Legenda: a,b ($p=0,03$)

No atinente ao metabólito $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, as concentrações séricas verificadas nos cães do subgrupo A – SF foram de 7,4 – 45,40; $24,83 \pm 13,36$ ng/mL antes do placebo, e 4,2 – 38,7; $21,45 \pm 12,11$ ng/mL após. No subgrupo A – CTM, observou-se 5,4 – 28,70; $15,13 \pm 9,4$ ng/mL no *baseline*, e 3,3 – 28,75; $16,68 \pm 10,72$ ng/mL após a terapia celular (Tabela 9).

Tabela 9 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ng/mL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

	A – SF	A – CTM
Pré – tratamento	$24,83 \pm 13,36$	$15,13 \pm 9,4$
Pós – tratamento	$21,45 \pm 12,11$	$16,68 \pm 10,72$

Não foram detectadas diferenças entre as médias dos valores séricos de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ antes e após o placebo (subgrupo A – SF); o mesmo foi observado no subgrupo A – CTM, ou seja, não houve diferença nos valores de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entre os períodos pré e pós-tratamento, com células-tronco mesenquimais (Gráfico 19).

Gráfico 19 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ng/mL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

Ainda a respeito da variável $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, considerando-se os subgrupos A – SF e A – CTM, não foram observadas diferenças entre eles nos períodos pré e pós-tratamento, conforme ilustração gráfica (Gráfico 20).

Gráfico 20 – Comparação entre as determinações séricas de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ng/mL) dos subgrupos A – SF e A – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

À análise do delta dos valores de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, não foi verificada diferença entre os subgrupos A – SF e A – CTM (Gráfico 21).

Gráfico 21 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações séricas de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ng/mL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.

6.4.2 Grupo B

No atinente ao subgrupo B – SF, o resultado observado para a variável $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ foi de 21,8 – 55,10; $40,71 \pm 14,37$ pg/mL antes, e 14,60 – 70,80; $34,30 \pm 19,32$ pg/mL após o placebo. Os cães do subgrupo B – CTM apresentaram 7,2 – 73,60; $30,94 \pm 23,20$ pg/mL de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ antes da terapia celular, e 7,90 – 67,30; $33,93 \pm 22,43$ pg/mL após (Tabela 10).

Tabela 10 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (pg/mL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

	B – SF	B – CTM
Pré – tratamento	$40,71 \pm 14,37$	$30,94 \pm 23,20$ pg/mL
Pós – tratamento	$34,30 \pm 19,32$	$33,93 \pm 22,43$

No subgrupo B – SF, não houve diferença entre as médias das determinações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ antes e após o placebo. No subgrupo B – CTM, também não se observou diferença entre os períodos pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais, considerando-se esta mesma variável (Gráfico 22).

Gráfico 22 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (pg/mL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

No que se refere aos subgrupos (B – SF e B – CTM), não foram identificadas diferenças entre eles, tanto antes, quanto após o tratamento (Gráfico 23).

Gráfico 23 – Comparação entre as determinações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ng/mL) dos subgrupos B – SF e B – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

À avaliação do delta (valores obtidos no pós-tratamento subtraídos dos valores obtidos no pré-tratamento), não foi verificada diferença nas mensurações da variável em questão entre os subgrupos B – SF e B – CTM (Gráfico 24).

Gráfico 24 – Delta dos Tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (pg/mL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.

No que se às determinações séricas de 25(OH)D₃, os valores observados no subgrupo B – SF foram de 10,90 – 74,60; $39,31 \pm 20,80$ ng/mL no *baseline*, e 2,5 – 71,90; $30,66 \pm 27,83$ ng/mL após o tratamento com solução fisiológica. Os cães do subgrupo B – CTM apresentaram 19,90 – 38,0; $27,70 \pm 6,35$ ng/mL antes, e 27,80 – 59,30; $36,80 \pm 11,77$ ng/mL de 25(OH)D₃ após a terapia com células-tronco mesenquimais (Tabela 11).

Tabela 11 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 25(OH)D₃ (ng/mL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

	B – SF	B – CTM
Pré – tratamento	$39,31 \pm 20,80$	$27,70 \pm 6,35$
Pós – tratamento	$30,66 \pm 27,83$	$36,80 \pm 11,77$

As mensurações de 25(OH)D₃ antes e após a administração de placebo não diferiram no subgrupo B – SF, e o mesmo foi verificado no outro subgrupo, tratado com terapia celular (subgrupo B – CTM) (Gráfico 25).

Gráfico 25 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de 25(OH)D₃ (ng/mL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

Contrapondo-se os subgrupos B – SF e B – CTM, não observou-se diferença entre eles no baseline e após o tratamento, conforme representação gráfica a seguir (Gráfico 26).

Gráfico 26 – Comparação entre as determinações séricas de 25(OH)D₃ (ng/mL) dos subgrupos B – SF e B – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

Considerando-se o delta das concentrações séricas de 25(OH)D₃, não houve diferença entre os valores observados nos subgrupos B – SF e B – CTM (Gráfico 27).

Gráfico 27 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações séricas de 25(OH)D₃ (ng/mL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.

Para a variável $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, os valores encontrados nos cães do subgrupo B – SF foram 1,6 – 20,80; $10,09 \pm 6,87$ ng/mL antes, e 1,80 – 11,60; $7,0 \pm 4,67$ ng/mL após o tratamento com solução fisiológica. No subgrupo que recebeu terapia celular (B – CTM), os resultados foram 4,10 – 14,10; $6,70 \pm 4,17$ ng/mL no *baseline*, e 4,0 – 16,10; $7,26 \pm 4,52$ ng/mL após o tratamento (Tabela 12).

Tabela 12 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ng/mL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

	B – SF	B – CTM
Pré – tratamento	$10,09 \pm 6,87$	$6,70 \pm 4,17$
Pós – tratamento	$7,0 \pm 4,67$	$7,26 \pm 4,52$

Não houve diferença entre as mensurações de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ antes e após a administração de placebo no subgrupo B – SF; no subgrupo B – CTM, resultados semelhantes foram observados, isto é, os valores desta variável não diferiram comparando-se os momentos pré e pós-terapia celular (Gráfico 28).

Gráfico 28 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ng/mL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

Considerando-se os subgrupos B – SF e B – CTM, não foram identificadas diferenças entre eles no *baseline*, e após o tratamento (Gráfico 29).

Gráfico 29 – Comparação entre as determinações séricas de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ng/mL) dos subgrupos B – SF e B – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

À análise do delta dos valores de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, não foi verificada diferença entre os subgrupos B – SF e B – CTM (Gráfico 30).

Gráfico 30 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações séricas de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ng/mL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.

6.4.3 Razão 24,25(OH)₂D₃ : 25(OH)D₃

A razão 24,25(OH)₂D₃ : 25(OH)D₃ no subgrupo A – SF foi de (mínimo – máximo; média $\pm$ desvio-padrão) 0,33 – 0,47; 0,41 $\pm$ 0,05 no pré, e 0,30 – 0,45; 0,39 $\pm$ 0,05 no pós-tratamento com placebo; no subgrupo A – CTM, obteve-se 0,29 – 0,65; 0,47 $\pm$ 0,13 antes, e 0,24 – 0,46; 0,38 $\pm$ 0,08 após a terapia celular.

Para aqueles cães do subgrupo B – SF, a razão 24,25(OH)₂D₃ : 25(OH)D₃ observada foi de 0,09 – 0,77; 0,27 $\pm$ 0,23 antes da administração de solução fisiológica, e 0,11 – 1,0; 0,40 $\pm$ 0,34 após. No outro subgrupo, que recebeu células-tronco mesenquimais (B – CTM), os resultados foram 0,13 – 0,37; 0,21 $\pm$ 0,09 no pré, e 0,12 – 0,56; 0,21 $\pm$ 0,17 no pós-tratamento.

Considerando-se os momentos de avaliação, não houve diferença entre os valores da razão 24,25(OH)₂D₃ : 25(OH)D₃ verificados no baseline e após a intervenção, em nenhum dos subgrupos.

Contra-pondo-se os subgrupos, também não houve diferença nos resultados da razão 24,25(OH)₂D₃ : 25(OH)D₃, o que foi observado tanto no pré, quanto no pós-tratamento com placebo ou células-tronco mesenquimais (Gráfico 31).

Gráfico 31 – Média $\pm$ desvio-padrão dos valores da razão 24,25(OH)₂D₃ : 25(OH)D₃ obtidos nos subgrupos A – SF e A – CTM, e B – SF e B – CTM, nos momentos pré e pós-tratamento.

6.5. PARATORMÔNIO (PTH)

6.5.1 Grupo A

No subgrupo A – SF, os valores obtidos foram de 0,8 – 5,6; $2,36 \pm 1,8$ pmol/L antes, e 1,15 – 7,10; $3,15 \pm 2,20$ pmol/L após o placebo, para as determinações de PTH. No subgrupo A – CTM, verificou-se 0,9 – 3,6; $1,81 \pm 1,0$ pmol/L antes da administração das células-tronco mesenquimais, e 1,6 – 3,45; $2,30 \pm 0,65$ pmol/L após (Tabela 13).

Tabela 13 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de Paratormônio (PTH), em pmol/L, nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

	A – SF	A – CTM
Pré – tratamento	$2,36 \pm 1,8$	$1,81 \pm 1,0$
Pós – tratamento	$3,15 \pm 2,20$	$2,30 \pm 0,65$

Não houve diferença nos valores de PTH entre as mensurações antes e após a administração de placebo no subgrupo A – SF; no subgrupo A – CTM, resultados semelhantes foram verificados, isto é, as determinações desta variável não diferiram contrapondo-se os momentos pré e pós-terapia celular (Gráfico 32).

Gráfico 32 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de Paratormônio (PTH) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

Quando comparados, os subgrupos não apresentaram diferenças quanto às concentrações séricas de PTH no *baseline*, e nem após o tratamento com placebo (A – SF) e terapia celular (A – CTM) (Gráfico 33).

Gráfico 33 – Comparação entre as determinações séricas de Paratormônio (PTH) dos subgrupos A – SF e A – CTM nos períodos pré e pós-tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

Considerando-se o delta das concentrações séricas de PTH, não foi observada diferença entre os valores obtidos no subgrupo A – SF e A – CTM (Gráfico 34).

Gráfico 34 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações séricas de PTH (pmol/L) nos subgrupos A – SF e A – CTM.

6.5.2 Grupo B

Para a variável PTH, no subgrupo que recebeu solução fisiológica (B – SF), os dados mostraram-se não paramétricos à análise estatística, sendo os valores mínimo – máximo e mediana apresentados a seguir: 0,8 – 28,3 pmol/L e mediana de 6,4 pmol/L antes da administração do placebo, e 0,55 – 153 pmol/L e mediana de 6,7 pmol/L após o referido tratamento (Tabela 14).

Tabela 14 – Mediana, mínimo e máximo das concentrações séricas de Paratormônio (PTH), em pmol/L, nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF).

B – SF	
	mediana (min - máx)
Pré – tratamento	6,4 (0,8 – 28,3)
Pós – tratamento	6,7 (0,55 – 153)

No subgrupo B – CTM, os valores obtidos para o PTH obedeceram a distribuição normal, sendo (mínimo – máximo; média $\pm$ desvio-padrão) 1,1 – 11,5; $5,28 \pm 3,9$ pmol/L antes, e 1,7 – 116,1; $42,48 \pm 39,32$ pmol/L após a terapia celular ($p= 0,03$) (Tabela 15).

Tabela 15 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de Paratormônio (PTH), em pmol/L, nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

B – CTM	
	média $\pm$ desvio-padrão
Pré – tratamento	$5,28 \pm 3,9^a$
Pós – tratamento	$42,48 \pm 39,32^b$

Legenda: a,b ($p= 0,03$)

Comparando-se os momentos pré e pós-tratamento no subgrupo que recebeu placebo (B – SF), não houve diferença entre as medianas para os valores de PTH (Gráfico 35).

Gráfico 35 - Valores mínimos, máximos e mediana das concentrações séricas de Paratormônio (PTH, em pmol/L) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF).

Já no subgrupo B – CTM, verificou-se que a média das concentrações séricas de PTH foram significativamente maiores após o tratamento com células-tronco mesenquimais, em relação ao baseline ($p=0,03$) (Gráfico 36).

Gráfico 36 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de Paratormônio (PTH, em pmol/L) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

Legenda: a,b ($p=0,03$)

Comparando-se os subgrupos B – SF e B – CTM nos momentos pré e pós-intervenção, não foram identificadas diferença entre eles no baseline, bem como após o tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, conforme os gráficos abaixo (Gráfico 37 e 38).

Gráfico 37 – Comparação entre as determinações séricas (média $\pm$ desvio-padrão) de Paratormônio (PTH) dos subgrupos B – SF e B – CTM, no período pré-tratamento, com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

Gráfico 38 – Comparação entre as determinações séricas (mínimo – máximo e mediana) de Paratormônio (PTH) dos subgrupos B – SF e B – CTM, no período pós-tratamento, com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

Quanto à análise do delta (valores obtidos no pós-tratamento subtraídos dos valores obtidos no pré-tratamento), não foi verificada diferença entre as medianas, para a variável PTH, nos subgrupos B – SF e B – CTM (Gráfico 39).

Gráfico 39 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações séricas de PTH (pmol/L) nos subgrupos B – SF e B – CTM.

6.6. CÁLCIO IÔNICO

6.6.1 Grupo A

A variável cálcio iônico foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos A – SF e A – CTM, conforme demonstrado no gráfico a seguir (Gráfico 40).

Gráfico 40 – Média das concentrações sanguíneas de cálcio iônico obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

Nos cães do subgrupo A – SF, os valores de cálcio iônico obtidos foram 1,28 – 1,55; $1,42 \pm 0,09$ mmol/L, antes do tratamento com placebo, e 1,29 – 1,43; $1,36 \pm 0,05$ mmol/L, após; no subgrupo A – CTM, os valores obtidos foram 1,31 – 1,51; $1,38 \pm 0,07$ mmol/L antes, e 1,33 – 1,36; $1,35 \pm 0,01$ mmol/L após a terapia com células-tronco mesenquimais, para a referida variável.

Não houve diferença entre os momentos de avaliação, tanto para o subgrupo tratado com placebo (A – SF), quanto para o subgrupo que recebeu terapia celular (A – CTM). Também não houve diferença entre os subgrupos no pré e pós-tratamento (Tabela 16).

Tabela 16 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações sanguíneas de cálcio iônico (mmol/L), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

	A – SF	A – CTM
Pré – tratamento	1,42 $\pm$ 0,09	1,38 $\pm$ 0,07
Pós – tratamento	1,36 $\pm$ 0,05	1,35 $\pm$ 0,01

Comparando-se as médias das variações entre os momentos de avaliação, pré e pós-tratamento, não houve diferença do delta para os valores de cálcio iônico, nos subgrupos A – SF e A – CTM (Gráfico 41).

Gráfico 41 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações sanguíneas de cálcio iônico (mmol/L) nos subgrupos A – SF e A – CTM.

6.6.2 Grupo B

A variável cálcio iônico foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos B – SF e B – CTM, conforme demonstrado no gráfico a seguir (Gráfico 42).

Gráfico 42 – Média das concentrações sanguíneas de cálcio iônico obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

No subgrupo B – SF, os valores obtidos de cálcio iônico foram de 1,28 – 1,53; $1,41 \pm 0,08$ mmol/L, antes, e 1,41 – 1,52; $1,46 \pm 0,05$ mmol/L, após o tratamento com placebo; no subgrupo B – CTM, os resultados observados para o cálcio iônico antes e após a terapia celular foram de, 1,35 – 1,52; $1,43 \pm 0,06$ mmol/L e 0,97 – 1,45; $1,22 \pm 0,18$ mmol/L, respectivamente.

Não houve diferença entre os momentos de avaliação, tanto para o subgrupo tratado com placebo (B – SF), quanto para o subgrupo que recebeu terapia celular (B – CTM). Também não houve diferença entre os subgrupos no pré e pós-tratamento (Tabela 17).

Tabela 17 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações sanguíneas de cálcio iônico (mmol/L), nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

	B – SF	B – CTM
Pré – tratamento	1,41 $\pm$ 0,08	1,43 $\pm$ 0,06
Pós – tratamento	1,46 $\pm$ 0,05	1,22 $\pm$ 0,18

Considerando-se o delta das concentrações sanguíneas de cálcio iônico, não houve diferença entre os resultados observados nos subgrupos B – SF e B – CTM (Gráfico 43).

Gráfico 43 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações sanguíneas de cálcio iônico (mmol/L) nos subgrupos B – SF e B – CTM.

6.7. CÁLCIO TOTAL

6.7.1 Grupo A

A variável cálcio total foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos, A – SF e A – CTM, conforme demonstrado no gráfico a seguir (Gráfico 44).

Gráfico 44 – Média das concentrações séricas de cálcio total obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

No subgrupo A – SF, os resultados obtidos foram 9,80 – 11,70 mg/dL (mínimo e máximo, respectivamente), média de 10,55 mg/dL e desvio-padrão de 0,67 mg/dL, no pré-tratamento, e 9,70 – 11,15; $10,20 \pm 0,51$ mg/dL no pós-tratamento com placebo. No subgrupo que recebeu terapia celular (A – CTM), as concentrações séricas de cálcio total verificadas foram de 9,19 – 12,60; $10,30 \pm 1,18$ mg/dL no pré, e 8,47 – 12,60; $10,15 \pm 0,70$ mg/dL no pós-tratamento.

Não houve diferença entre os momentos de avaliação, tanto para o subgrupo tratado com placebo (A – SF), quanto para o subgrupo que recebeu terapia celular (A – CTM). Também não houve diferença entre os subgrupos no pré e pós-tratamento (Tabela 18).

Tabela 18 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de cálcio total (mg/dL), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

	A – SF	A – CTM
Pré – tratamento	10,55 $\pm$ 0,67	10,30 $\pm$ 1,18
Pós – tratamento	10,20 $\pm$ 0,51	10,15 $\pm$ 0,70

Quanto à análise do delta (valores obtidos no pós-tratamento subtraídos dos valores obtidos no pré-tratamento), não foi verificada diferença entre as médias, para a variável cálcio total sérico, nos subgrupos A – SF e A – CTM (Gráfico 45).

Gráfico 45 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações séricas de cálcio total (mg/dL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.

6.7.2 Grupo B

A variável cálcio total foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos, B – SF e B – CTM, conforme demonstrado no gráfico a seguir (Gráfico 46).

Gráfico 46 – Média das concentrações séricas de cálcio total obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

A concentração de cálcio total observada no subgrupo A – SF foi de 9,2 – 12; $10,32 \pm 0,93$ mg/dL no pré-tratamento, e 8,52 – 12,18; $10,47 \pm 1,27$ após o placebo. No subgrupo tratado com células-tronco mesenquimais, os resultados obtidos foram 9,43 – 14; $11,11 \pm 1,54$ mg/dL antes da intervenção, e 9,92 – 12,03; $10,86 \pm 0,74$ após.

Contrapondo-se os momentos de avaliação, não houve diferença nas médias das concentrações séricas de cálcio total entre os tempos pré e pós-tratamento, tanto no subgrupo B – SF, quanto no subgrupo B – CTM. Comparando-se os tratamentos, também não foram observadas diferenças entre os subgrupos B – SF e B – CTM no baseline, e no pós-tratamento (Tabela 19).

Tabela 19 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de cálcio total (mg/dL), nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B – SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

	B – SF	B – CTM
Pré – tratamento	10,32 $\pm$ 0,93	11,11 $\pm$ 1,54
Pós – tratamento	10,47 $\pm$ 1,27	10,86 $\pm$ 0,74

Quanto à análise do delta (valores da variável obtidos no pós-tratamento subtraídos dos valores obtidos no baseline), não foi verificada diferença entre as médias de cálcio total, comparando-se os subgrupos B – SF e B – CTM (Gráfico 47).

Gráfico 47 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações séricas de cálcio total (mg/dL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.

6.8. FRAÇÃO DE EXCREÇÃO URINÁRIA DE CÁLCIO

6.8.1 Grupo A

A variável fração de excreção urinária de cálcio foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos, A – SF e A – CTM, conforme demonstrado no gráfico a seguir (Gráfico 48).

Gráfico 48 – Média das frações de excreção urinária de cálcio (FEuCa; %) obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

Nos cães do subgrupo A – SF, as mensurações foram de 0,11% a 1,07%, e média de 0,41%, com desvio-padrão de 0,33%, no baseline; no pós-tratamento, obteve-se 0,08 - 0,78; $0,36 \pm 0,25$ %. No subgrupo A – CTM, as determinações estão descritas a seguir: 0,19 - 2,02; $1,05 \pm 0,75$ % no pré e 0,13 - 0,84; $0,57 \pm 0,30$ % no pós-tratamento (Tabela 20).

Tabela 20 – Média $\pm$ desvio – padrão da fração de excreção urinária de cálcio, em porcentagem (%), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (A - SF) e células-tronco mesenquimais (A – CTM).

	A – SF	A – CTM
Pré – tratamento	$0,41 \pm 0,33$	$1,05 \pm 0,75$
Pós – tratamento	$0,36 \pm 0,25$	$0,57 \pm 0,30$

No grupo C, as mensurações de fração de excreção urinária de cálcio foram 0,06 – 1,37; $0,35 \pm 0,39$ %, resultados estes aqui apresentados, com o objetivo de se estabelecer valores de referência de normalidade da variável supracitada, para fins comparativos com os grupos de estudo.

No subgrupo A – SF, não foi identificada diferença entre o pré e pós-tratamento na fração de excreção urinária de cálcio, e o mesmo foi observado no subgrupo A – CTM. Comparando-se os subgrupos, não houve diferença entre eles, tanto antes, quanto após a intervenção.

O gráfico a seguir ilustra as determinações obtidas de fração de excreção urinária de cálcio nos cães que receberam placebo e terapia celular, antes e após o tratamento, e os valores obtidos nos cães clinicamente normais (Gráfico 49).

Gráfico 49 – Média $\pm$ desvio-padrão da fração de excreção urinária de cálcio, em porcentagem (%), dos cães clinicamente normais, e dos subgrupos A – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e A – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).

À análise do delta, não foi verificada diferença entre as médias da fração de excreção urinária de cálcio, comparando-se os subgrupos A – SF e A – CTM (Gráfico 50).

Gráfico 50 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para fração de excreção urinária de cálcio (%) nos subgrupos A – SF e A – CTM.

6.8.2 Grupo B

A variável fração de excreção urinária de cálcio foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos, B – SF e B – CTM, conforme demonstrado no gráfico a seguir (Gráfico 51).

Gráfico 51 – Média das frações de excreção urinária de cálcio (FEuCa; %) obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

Nos cães do subgrupo B – SF, os resultados obtidos para a fração de excreção urinária de cálcio foram 0,24 - 2,73; $1,06 \pm 0,96$ % no pré, e 0,28 - 1,88; $0,91 \pm 0,53$ % no pós-tratamento. No subgrupo B – CTM, as determinações estão descritas a seguir: 0,07 - 2,55; $0,71 \pm 0,81$ % no baseline, e 0,07 - 1,91; $0,80 \pm 0,63$ % após a terapia celular (Tabela 21).

Tabela 21 – Média $\pm$ desvio – padrão da fração de excreção urinária de cálcio, em porcentagem (%), nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (B - SF) e células-tronco mesenquimais (B – CTM).

	B – SF	B – CTM
Pré – tratamento	$1,06 \pm 0,96$	$0,71 \pm 0,81$
Pós – tratamento	$0,91 \pm 0,53$	$0,80 \pm 0,63$

Não houve diferença entre as médias da referida variável comparando-se os momentos pré e pós-intervenção, tanto com placebo, quanto com células-tronco mesenquimais. Contrapondo-se os subgrupos nos referidos tempos de avaliação, também não foi verificada diferença entre os tratamentos.

O gráfico a seguir representa a média e o desvio-padrão da fração de excreção urinária de cálcio nos cães que receberam placebo e terapia celular, antes e após o tratamento, e os valores obtidos nos cães clinicamente normais, utilizados como referência para a variável supracitada (Gráfico 52).

Gráfico 52 – Média $\pm$ desvio-padrão da fração de excreção urinária de cálcio, em porcentagem (%), dos cães clinicamente normais, e dos subgrupos B – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e B – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).

Quanto ao delta da fração de excreção urinária de cálcio (valores da variável obtidos no pós-tratamento subtraídos dos valores obtidos no baseline), não foi verificada diferença entre as médias, comparando-se os subgrupos B – SF e B – CTM (Gráfico 53).

Gráfico 53 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para a fração de excreção urinária de cálcio (%) nos subgrupos B – SF e B – CTM.

6.9. FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 (FGF-23)

6.9.1 Grupo A

No subgrupo A – SF, foi possível realizar a mensuração do FGF-23 sérico em quatro animais ($n= 4$), nos quais verificou-se 178,7 – 683; $356 \pm 223,8$ pg/mL antes, e 119,2 – 859,3; $380 \pm 327,5$ pg/mL após a aplicação do placebo. Já no subgrupo A – CTM, a determinação de FGF-23 foi realizada somente em dois cães ($n= 2$), e as concentrações séricas obtidas foram de 1065,6 pg/mL e 505,5 pg/mL antes, e 718,25 pg/mL e 508,10 pg/mL após a terapia celular, respectivamente.

Devido ao tamanho amostral, realizou-se somente a estatística descritiva; os resultados estão representados a seguir (Gráfico 54).

Gráfico 54 - Valores individuais de FGF-23 observados nos momentos pré e pós-tratamento com placebo (subgrupo A – SF; n= 4) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM; n= 2).

Não foi possível avaliar o efeito do tratamento devido ao tamanho amostral. Entretanto, para fins ilustrativos, os gráficos a seguir demonstram os valores individuais de FGF-23 obtidos nos cães do subgrupo A – SF (n= 4) em comparação aos do subgrupo A – CTM (n= 2), no baseline e após a intervenção (Gráfico 55).

Gráfico 55 –Valores individuais de FGF-23 (pg/mL) nos subgrupos A – SF e A – CTM, no pré e pós-tratamento, com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

A diferença no delta dos valores de FGF-23 entre os subgrupos A – SF e A – CTM não pôde ser testada em virtude do reduzido tamanho amostral, mas, para efeitos de visualização, a análise descritiva está representada a seguir. Um dos cães do subgrupo A – CTM, apresentou valores de FGF-23 expressamente menores ao final do tratamento, quando comparado aos demais (Gráfico 56).

Gráfico 56 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para a variável FGF-23 (pg/mL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.

6.9.2 Grupo B

No subgrupo B – SF, somente quatro animais ($n = 4$) tiveram as determinações de FGF-23 realizadas, as quais estão descritas a seguir (mínima – máxima; média $\pm$ desvio-padrão): 957,6 – 1866; $1415 \pm 453,8$ pg/mL antes, e 1022 – 17524; 7160 ± 7700 pg/mL após o placebo.

No subgrupo B – CTM, as mensurações de FGF-23 foram efetuadas em sete animais ($n= 7$), sendo 1046 – 14193; 5091 ± 4657 pg/mL e 1645 – 98866; 20471 ± 35289 pg/mL os valores obtidos no pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais, respectivamente (Tabela 22).

Tabela 22 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações sanguíneas de FGF-23 (pg/mL), nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo B – CTM).

	B – SF (n= 4)	B – CTM (n= 7)
Pré – tratamento	1415 $\pm$ 453,8	5091 $\pm$ 4657
Pós – tratamento	7160 $\pm$ 7700	20471 $\pm$ 35289

Devido ao número reduzido de animais no subgrupo B – SF, realizou-se somente a estatística descritiva; abaixo, o gráfico representa os valores individuais de FGF-23 observados, antes e após o placebo (Gráfico 57).

Gráfico 57 – Valores individuais de FGF-23 (pg/mL) dos cães do subgrupo B – SF, pré e pós-tratamento com solução fisiológica.

No atinente aos cães do subgrupo B – CTM e os momentos de avaliação, não foi verificada diferença nas concentrações séricas de FGF-23 antes e após a terapia celular (Gráfico 58).

Gráfico 58 - Valores mínimos, máximos e mediana das determinações séricas de FGF-23 (pg/mL) nos cães do subgrupo B – CTM, antes e após o tratamento com células-tronco mesenquimais.

Devido ao número reduzido de animais, não foi possível comparar os efeitos do placebo e da terapia celular sobre a variável em estudo; a seguir, a representação gráfica dos valores individuais de FGF-23 observados nos cães dos subgrupos B – SF (n= 4) e B – CTM (n= 7) no baseline, e após a intervenção (Gráfico 59).

Gráfico 59 – Valores individuais de FGF-23 (pg/mL) nos subgrupos B – SF e B – CTM, antes e após o tratamento com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

6.10. FÓSFORO

6.10.1 Grupo A

A variável fósforo sérico foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos, A – SF e A – CTM. À análise dos momentos de avaliação, foi constatada diferença entre os tempos “T2” versus “T6” ($p < 0,05$), conforme representado no gráfico a seguir. Embora aparente, não houve diferença entre as médias de fósforo sérico nos tempos “T0” versus “T12”, em ambos os subgrupos (Gráfico 61).

Gráfico 61 – Média das concentrações séricas de fósforo (mg/dL) obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

Legenda: a,b ($p < 0,05$)

No subgrupo A – SF, obteve-se como resultado das determinações séricas de fósforo 1,90 – 4,2; $3,46 \pm 0,88$ mg/dL antes, e 1,90 – 5,4; $3,55 \pm 0,71$ mg/dL após o placebo; no subgrupo A – CTM, verificou-se 2,48 – 4,41; $3,38 \pm 0,73$ mg/dL antes da terapia celular, e 2,15 – 5,51; $3,53 \pm 0,68$ mg/dL após (Tabela 23).

Tabela 23 – Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de fósforo (mg/dL), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

	A – SF	A – CTM
Pré – tratamento	$3,46 \pm 0,88$	$3,52 \pm 0,73$
Pós – tratamento	$3,55 \pm 0,71$	$3,53 \pm 0,68$

Não houve diferença entre os valores de fósforo no pré e no pós-tratamento, tanto no subgrupo A – SF, quanto no subgrupo A – CTM (Gráfico 62).

Gráfico 62 - Média $\pm$ desvio-padrão das concentrações séricas de fósforo (mg/dL) nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

Contrapondo-se os subgrupos, não houve diferença entre eles no baseline e após o tratamento, para as determinações de fósforo sérico. O gráfico a seguir ilustra este resultado, ao comparar os subgrupos A – SF, que recebeu o placebo, e A – CTM, para o qual foi administrada a terapia celular, nos momentos pré e pós-intervenção (Gráfico 63).

Gráfico 63 – Comparação entre as determinações séricas de fósforo (mg/dL) dos subgrupos A – SF e A – CTM, nos períodos pré e pós tratamento, com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

Quanto à análise do delta (valores obtidos no pós-tratamento subtraídos dos valores obtidos no pré-tratamento), não foi verificada diferença entre as médias, para a variável fósforo sérico, nos subgrupos A – SF e A – CTM (Gráfico 64).

Gráfico 64 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações séricas de fósforo (mg/dL) nos subgrupos A – SF e A – CTM.

6.10.2 Grupo B

A variável fósforo sérico foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos, B – SF e B – CTM (Gráfico 65).

Gráfico 65 – Mediana das concentrações séricas de fósforo (mg/dL) obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

Os dados da variável fósforo sérico apresentaram distribuição não-paramétrica. No subgrupo B – SF, verificou-se (mínimo – máximo; mediana): 3,6 – 8,5; 4,4 mg/dL, antes da aplicação do placebo, 3,1 – 11,8; 4,8 mg/dL após. No subgrupo B – CTM, os resultados obtidos foram 2,5 – 6,6; 5,0 mg/dL no pré, e 3,0 – 16,0; 5,12 mg/dL no pós-tratamento com células tronco-mesenquimais (Tabela 24).

Tabela 24 – Valores de mediana, mínimo e máximo das concentrações séricas de fósforo (mg/dL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B – SF) e células tronco-mesenquimais (B – CTM).

	B – SF	B – CTM
	mediana (min – max)	
Pré – tratamento	4,4 (3,6 – 8,5)	5,0 (2,5 – 6,6)
Pós – tratamento	4,8 (3,1 – 11,8)	5,12 (3,0 – 16)

Comparando-se os momentos de avaliação, não foram observadas diferenças entre o baseline e o pós-tratamento nos subgrupos B – SF e B – CTM (Gráficos 66).

Gráfico 66 – Box plot das concentrações séricas de fósforo (mg/dL) nos cães do grupo B, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo B - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

Contrapondo-se os subgrupos, não houve diferença entre eles, tanto no momento pré, quanto no pós-tratamento, para a variável fósforo sérico (Gráfico 67).

Gráfico 67 – Comparação entre as determinações séricas de fósforo (mg/dL) dos subgrupos B – SF e B – CTM, nos períodos pré e pós tratamento, com placebo e células-tronco mesenquimais, respectivamente.

Quanto ao delta dos valores de fósforo sérico, não houve diferença entre as medianas dos subgrupos B – SF e B – CTM (Gráfico 68).

Gráfico 68 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para as concentrações séricas de fósforo (mg/dL) nos subgrupos B – SF e B – CTM.

6.11. FRAÇÃO DE EXCREÇÃO URINÁRIA DE FÓSFORO

6.11.1 Grupo A

A variável fração de excreção urinária de fósforo foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos, A – SF e A – CTM, conforme demonstrado no gráfico a seguir (Gráfico 69).

Gráfico 69 – Média das frações de excreção urinária de fósforo (FEuP; %) obtidas nos cães dos subgrupos A – SF e A – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

Os valores das frações de excreção urinária de fósforo nos cães clinicamente normais foram de 0,9% a 67,60%, e mediana de 10,15%, resultados estes aqui apresentados com o intuito de se estabelecer a referencia de normalidade, para fins comparativos com os grupos de estudo.

No subgrupo A – SF, observou-se 4,6% - 25,90%; $10,91 \pm 7,68$ % antes do placebo, e 1,38 – 45,18; $14,52 \pm 9,97$ % após. No subgrupo A – CTM, os resultados obtidos foram 4,65 – 47,69; $27,59 \pm 19,39$ % antes, e 5,7 – 100,8; $41,82 \pm 25,21$ % após a terapia celular (Tabela 25).

Tabela 25 – Média $\pm$ desvio-padrão da fração de excreção urinária de fósforo (FEuP%), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

	A – SF	A – CTM
Pré – tratamento	$10,91 \pm 7,68$	$27,59 \pm 19,39$
Pós – tratamento	$14,52 \pm 9,97$	$41,82 \pm 25,21$

Não houve diferença entre as médias da variável supracitada comparando-se os momentos pré e pós-intervenção, tanto com placebo, quanto com células-tronco mesenquimais. Contrapondo-se os subgrupos nos referidos tempos de avaliação, também não foi verificada diferença entre os tratamentos.

O gráfico a seguir representa a média e o desvio-padrão da fração de excreção urinária de fósforo nos cães que receberam placebo e terapia celular, antes e após o tratamento, e os valores obtidos nos cães clinicamente normais, utilizados como referência para a referida variável (Gráfico 70).

Gráfico 70 – Média $\pm$ desvio-padrão da fração de excreção urinária de fósforo, em porcentagem (%), dos cães clinicamente normais, e dos subgrupos A – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e A – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).

Quanto ao delta da fração de excreção urinária de fósforo (valores da variável obtidos no pós-tratamento subtraídos dos valores obtidos no baseline), não foi verificada diferença entre as médias, comparando-se os subgrupos A – SF e A – CTM (Gráfico 71).

Gráfico 71 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para a fração de excreção urinária de fósforo (%) nos subgrupos A – SF e A – CTM.

6.11.2 Grupo B

A variável fração de excreção urinária de fósforo foi mensurada ao longo dos 12 meses de acompanhamento clínico em ambos os subgrupos, B – SF e B – CTM, conforme demonstrado no gráfico a seguir (Gráfico 72).

Gráfico 72 – Média das frações de excreção urinária de fósforo (FEuP; %) obtidas nos cães dos subgrupos B – SF e B – CTM, ao longo de 12 meses de acompanhamento.

No subgrupo A – SF, as frações de excreção urinária de fósforo observadas foram (mínimo – máximo; média $\pm$ desvio padrão): 7,42 – 34,94; 18,03 $\pm$ 9,21% antes, e 2,27 – 92,80; 26,53 $\pm$ 17,46 % após o placebo. Para aqueles cães que receberam terapia celular, os resultados observados foram 15,64 – 63,89; 31,45 $\pm$ 15,04 % antes, e 4,07 – 79,47; 31,68 $\pm$ 18,51 % após o tratamento com células-tronco mesenquimais (Tabela 26).

Tabela 26 – Média $\pm$ desvio-padrão das frações de excreção urinária de fósforo, em porcentagem (%), nos cães do grupo A, antes e após o tratamento com placebo (subgrupo A - SF) e células-tronco mesenquimais (subgrupo A – CTM).

	A – SF	A – CTM
Pré – tratamento	18,03 $\pm$ 9,21	31,45 $\pm$ 15,04
Pós – tratamento	26,53 $\pm$ 17,46	31,68 $\pm$ 18,51

Comparando-se os momentos, não houve diferença entre as médias das frações de excreção urinária de fósforo entre o pré e pós-tratamento, para ambos os subgrupos. Entre os tratamentos também não houve diferença, tanto no baseline, quanto no pós-tratamento.

O gráfico a seguir representa a média e o desvio-padrão da fração de excreção urinária de fósforo nos cães que receberam placebo e terapia celular, antes e após o tratamento, e os valores obtidos nos cães clinicamente normais, utilizados como referência para a referida variável (Gráfico 73).

Gráfico 73 – Média $\pm$ desvio-padrão da fração de excreção urinária de fósforo, em porcentagem (%), dos cães clinicamente normais, e dos subgrupos B – SF (pré e pós-tratamento com placebo) e B – CTM (pré e pós-tratamento com células-tronco mesenquimais).

Quanto ao delta (valores no pós-tratamento subtraído dos valores no pré-tratamento para a variável em questão), não observou-se diferença entre as médias das determinações da fração de excreção urinária de fósforo nos subgrupos B – SF e B – CTM. Entretanto, os resultados obtidos nos cães tratados com terapia celular foram notadamente menores (Gráfico 74).

Gráfico 74 – Delta dos tempos pós e pré-tratamento ($\Delta T_{\text{pós}} - T_{\text{pré}}$) para a fração de excreção urinária de fósforo (%) nos subgrupos B – SF e B – CTM.

6.12. ANÁLISE DE SOBREVIDA

6.12.1 Análise de sobrevida comparando-se os tratamentos

No grupo A, composto por animais doentes renais crônicos no estágio 2, não houve óbito, de modo que, a proporção de sobrevida observada no subgrupo A – SF, tratado com placebo, e A – CTM, tratado com células-tronco mesenquimais, foi de 100% ao final dos 360 dias de acompanhamento (12 meses). Não houve diferença nas curvas de sobrevida entre os subgrupos supracitados (Gráfico 75).

Gráfico 75 – Curva de sobrevida de Kaplan-Meier dos cães do subgrupo A – SF e A – CTM ao longo dos 360 dias (12 meses) de acompanhamento clínico.

Nos cães no estágio 3 da doença renal crônica (grupo B) foi observada a ocorrência de óbitos em ambos os subgrupos. No subgrupo B – SF, tratado com placebo, a mediana de dias de sobrevida foi de 228 dias, e três cães foram a óbito nos dias 90, 120 e 150. No subgrupo que recebeu terapia celular, B – CTM, a mediana de dias de sobrevida foi de 315 dias, e quatro cães foram a óbito nos dias 60, 120, 180 e 270. Não houve diferença nas curvas de sobrevida entre os subgrupos B – SF e B – CTM (Gráfico 76).

Gráfico 76 – Curva de sobrevida de Kaplan-Meier dos cães do subgrupo B – SF e B – CTM ao longo dos 360 dias (12 meses) de acompanhamento clínico.

Independentemente dos estágios da doença renal crônica, considerando-se, portanto, somente os tratamentos, observou-se que a proporção de sobrevivência ao final dos 360 dias de acompanhamento foi semelhante entre os subgrupos tratados com placebo (76%) ou células-tronco mesenquimais (71%) (Gráfico 77).

Gráfico 77 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos cães tratados com placebo ou células-tronco mesenquimais nos estágios 2 e 3 da doença renal crônica (grupos A e B), ao longo dos 360 dias (12 meses) de acompanhamento clínico.

6.12.2 Análise de sobrevida para a variável $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

A proporção de sobrevida dos cães que apresentaram valores de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inferiores a 35 pg/mL foi de 58%, ao final dos 360 dias de acompanhamento. Para aqueles cujas determinações estiveram entre 35 e 55 pg/mL, a proporção de sobrevida observada foi de 77%, ao final dos 360 dias de acompanhamento. Considerando-se este mesmo período de avaliação, os cães nos quais as concentrações de calcitriol variaram de 56 a 76 pg/mL, e acima de 76 pg/mL, verificou-se 85% e 100% de proporção de sobrevida, respectivamente, ao final do estudo. Não houve diferença nas curvas de sobrevida entre os valores de quartis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Gráfico 78).

Gráfico 78 – Curva de sobrevida de Kaplan-Meier de acordo com os valores de quartis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ observados nos cães incluídos no estudo, ao longo dos 360 dias (12 meses) de acompanhamento clínico.

6.12.3 Análise de sobrevida para a variável PTH

A proporção de sobrevida dos cães que apresentaram valores de PTH inferiores a 0,5 pmol/L foi de 100%, ao final dos 360 dias de acompanhamento; igual proporção de sobrevida foi observada naqueles animais cujas determinações variaram de 0,5 a 2,5 pmol/L e 2,6 a 8,0 pmol/L. Entretanto, valores acima de 8,0 pmol/L de PTH implicaram em redução progressiva da proporção de sobrevida ao longo do estudo, de modo que, no dia 60, a taxa de sobrevida encontrada foi de 87,5%, no dia 90 foi 75%, no dia 120, esta foi de 50%; as proporções de sobrevida observadas nos momentos subsequentes foram ainda mais baixas: 37,5% no dia 150, 25% no dia 180, e 12,5% nos dias 270 e 360. A mediana de dias de sobrevida para aqueles cães que apresentaram valores de PTH > 8 pmol/L foi de apenas 135 dias. Houve diferença nas curvas de sobrevida entre os valores de quartis de PTH ($p < 0,0001$) (Gráfico 79).

Gráfico 79 – Curva de sobrevida de Kaplan-Meier de acordo com os valores de quartis de PTH observados nos cães incluídos no estudo, ao longo dos 360 dias (12 meses) de acompanhamento clínico.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, não é possível atribuir os efeitos observados sobre o metabolismo mineral à terapia com células-tronco mesenquimais. Entretanto, resultados promissores foram observados acerca dos metabólitos da vitamina D₃ nos animais que receberam terapia celular, principalmente naqueles no estágio 2 da DRC.

Neste mesmo subgrupo (A – CTM), no atinente aos marcadores de função renal, verificou-se a tendência de redução nos valores médios de creatinina sérica, ao final do acompanhamento (“T7” a “T12”), em comparação ao subgrupo placebo. Em contrapartida, nos cães com doença renal crônica mais avançada (estágio 3) que receberam terapia celular (B – CTM), observou-se maior média da concentração sérica de creatinina após o tratamento, em comparação ao placebo, ainda que sem diferença estatística.

Entretanto, vale ressaltar que os valores desta variável no subgrupo B – CTM tendiam a ser mais altos desde o baseline, e assim permaneceram até o nono mês de acompanhamento. Do “T9” em diante, os valores de creatinina sérica do subgrupo B – CTM decaíram consideravelmente, ainda que sem diferença significativa, e assemelham-se aos valores do subgrupo placebo. Tal resultado pode ser justificado pelo fato de, no referido momento de avaliação, o cão B#7, do subgrupo B – CTM, ter ido à óbito. Este cão apresentava doença renal crônica juvenil e azotemia grave persistente.

No atinente à uréia sérica, para aqueles cães no estágio 2 que receberam terapia celular (A – CTM), observou-se a tendência de redução dos valores médios desta variável no pós-tratamento, ainda que no baseline as determinações tenham sido mais altas neste subgrupo, quando comparadas àquelas do subgrupo placebo (A – SF), embora sem diferença estatística.

Resultados de revisão sistemática e meta-análise, que avaliaram o efeito de células tronco-mesenquimais na doença renal crônica induzida experimentalmente, demonstraram que a terapia celular melhorou a função e a morfologia renal em modelos pré-clínicos. Dentre os indicadores avaliados, a concentração de uréia plasmática apresentou redução significativa, e ainda foi correlacionada com a

melhora da glomeruloesclerose e da fibrose intersticial em ratos e camundongos (ALEXANDRE et al., 2009; ALFARANO et al., 2012; PAPAZOVA et al., 2015).

Em gatos com DRC de ocorrência natural, *clinical trials* com limitado número de animais e tempo de acompanhamento que variaram de 60 a 90 dias, não foram conclusivos acerca dos efeitos das CTMs sobre os marcadores de função renal (QUIMBY et al., 2016; THOMSON et al., 2019). Em cães, até o presente momento, estudos clínicos que tenham testado a eficácia da terapia celular na DRC são desconhecidos. Entretanto, um estudo experimental realizado em modelos caninos de injúria renal aguda induzida por gentamicina, demonstrou redução significativa nas concentrações sanguíneas de compostos nitrogenados (*Blood Urea Nitrogen*; BUN) após a aplicação de CTMs, em comparação ao placebo (LEE et al., 2017).

Dois mecanismos principais pelos quais a terapia celular pode contribuir para a melhora da função renal na DRC têm sido estudados. O primeiro deles seria que as CTMs estimulariam as células-tronco renais a sofrerem mitose, diferenciação e migração, de modo a promoverem reparação tecidual direta. O outro mecanismo refere-se aos efeitos parácrinos e endócrinos exercidos pelas CTMs, por meio da secreção de fatores bioativos e exosomas, que apresentam funções imunomodulatórias, antiapoptóticas, angiogênicas e antifibróticas. (VILLANUEVA et al., 2011; CANTALUPPI et al., 2013; VILLANUEVA et al., 2013; LEE et al., 2017). Evidências indicam que os efeitos benéficos ocasionados pelas CTMs na DRC sejam de origem predominantemente parácrina, mediados principalmente pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (CANTALUPPI et al., 2013; QUIMBY; BORJESSON, 2018).

No presente estudo, não é possível afirmar que a tendência de melhora na média dos valores de uréia sérica, encontrada nos cães doentes renais crônicos no estágio 2 tratados com CTMs, tenha sido ocasionada por tais efeitos, sendo necessárias investigações futuras, com o desenho apropriado e a utilização de marcadores específicos.

Por outro lado, os cães no estágio 3 da doença renal crônica que receberam terapia celular, apresentaram aumento nas concentrações séricas de uréia, tendência esta, também observada no grupo placebo, porém em menores proporções. No entanto, a média dos valores de uréia do subgrupo tratado com CTMs já era consideravelmente mais alta desde o baseline, ainda que sem diferença significativa em comparação ao placebo.

Estudos demonstraram que as CTMs submetidas à microambiente urêmico apresentaram diminuição na expressão de VEGF, aumento da senescência celular, redução da angiogênese e perda do potencial regenerativo (NOH et al., 2012; KLINKHAMMER et al., 2014). Assim sendo, é provável que os efeitos desejáveis da terapia celular sejam atenuados ou até mesmo anulados em indivíduos com DRC avançada, o que poderia eventualmente justificar os piores resultados observados no subgrupo B – CTM (DRC estágio 3), quando comparados aos do A – CTM (DRC estágio 2), para as variáveis em estudo (Apêndice A).

Quanto aos metabólitos da vitamina D₃, os cães no estágio 2 e 3 da DRC que receberam terapia celular (A – CTM e B – CTM), tenderam a apresentar maiores concentrações séricas de 1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃ e 24,25(OH)₂D₃ após o tratamento com CTMs, em comparação ao baseline e ao placebo; os valores das variáveis supracitadas mantiveram-se estáveis ou reduzidos, após a administração de solução fisiológica nos subgrupos A – SF e B – SF (Figura 7).

Figura 7 – Média ± desvio-padrão das concentrações séricas dos metabólitos 1,25(OH)₂D₃ (pg/mL), 25(OH)D₃ (ng/mL) e 24,25(OH)₂D₃ (ng/mL) dos grupos A e B, antes e após o tratamento com solução fisiológica (SF) ou células-tronco mesenquimais (CTM).

Legenda:

- 1,25(OH)₂D₃ (pg/mL)
- 25(OH)D₃ (ng/mL)
- 24,25(OH)₂D₃ (ng/mL)

Os rins desempenham importante papel no metabolismo da vitamina D. Nas células tubulares proximais, o precursor calcidiol é convertido pela enzima 1-alfa-hidroxilase (CYP24A1) em calcitriol, que é a forma ativa da vitamina D₃. Desta forma, a perda de massa renal contribui criticamente para a deficiência de 1,25(OH)₂D₃ observada na doença renal crônica (BLOCK et al., 2013), o que, por sua vez, está de acordo com os resultados observados. Os cães no estágio 2 da DRC (grupo A) apresentaram concentrações maiores de 1,25(OH)₂D₃, do que aqueles no estágio 3 (grupo B), e portanto, com DRC mais avançada.

O tratamento com CTMs em modelos pré-clínicos de nefrectomia 5/6 resultou em redução da fibrose renal. Um estudo demonstrou que a expressão de alfa-SMA e TGF-beta 1 foi significativamente menor no grupo que recebeu terapia celular, em comparação ao placebo, o que comprova os benefícios antifibróticos da terapia celular. O estudo demonstrou ainda que tais efeitos não estiveram permanentemente atrelados à melhora dos marcadores de função renal, uma vez que, mesmo diante da ausência de melhora de creatinina e uréia, a expressão de alfa-SMA e TGF-beta 1 permaneceu, de modo significante, aquém do placebo (BIAN et al., 2014).

Em outro estudo, sobre o uso de CTMs na doença renal crônica, que utilizou modelos submetidos à nefrectomia (5/6) + injúria-reperfusão, os efeitos antifibróticos da terapia celular foram observados, particularmente, sobre as células tubulares. Uma parte do experimento *in vitro* demonstrou que as células do epitélio tubular proximal renal, tratadas com TGF-Beta, quando incubadas no meio de condicionamento das CTMs, não sofreram transição epitélio-mesenquimal. Este resultado permitiu aos autores concluir que, parte da ação antifibrótica das CTMs decorre dos seus efeitos diretos sobre as células tubulares (ALFARANO et al., 2012).

Em um estudo paralelo ao apresentado nesta tese de doutorado, que utilizou os mesmos animais, o nosso grupo de pesquisa avaliou a presença de uVDBP (Urinary Vitamin D-binding protein), um marcador precoce de lesão tubular proximal em cães. A média da imunodeteção desta variável nos cães doentes renais crônicos nos estágios 2 e 3 manteve-se dentro da normalidade após o tratamento com células-tronco mesenquimais (ou placebo; não houve diferença entre as terapias); este achado pode indicar que não houve lesão tubular proximal, ou ainda,

que a magnitude da lesão era discreta nestes animais (CARAGELASCO, 2017; CHACAR et al., 2017).

Não é possível afirmar que os resultados aqui obtidos para a variável $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, sejam atribuídos à provável integridade dos túbulos proximais, ou aos efeitos antifibróticos decorrentes da terapia celular. Entretanto, estas podem ser explicações, com base nos resultados dos estudos acima descritos, para a tendência de as concentrações séricas de calcitriol terem sido mais altas nos subgrupos que receberam células-tronco mesenquimais, em comparação ao placebo. A mensuração de marcadores de crescimento tecidual em investigações futuras pode ser de grande valia para elucidar estes aspectos.

O aumento significativo das concentrações séricas de $25(\text{OH})\text{D}_3$ nos cães doentes renais crônicos no estágio 2, após a terapia celular, também pode explicar o incremento nos valores de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, observado especialmente no subgrupo A – CTM. A conversão de calcitriol a partir do calcidiol é dependente deste substrato; logo, a maior quantidade disponível de $25(\text{OH})\text{D}_3$ favorece à ativação da vitamina D_3 (HAZEWINKEL; TRYFONIDOU, 2002; PARKER et al., 2017).

No atinente ao aumento significativo das determinações de $25(\text{OH})\text{D}_3$ nos cães do subgrupo A – CTM, esta pode estar atrelada à redução dos valores médios de uréia sérica verificada nestes cães. A uremia compromete a síntese hepática de calcidiol, devido à redução mediada por PTH de isoformas de CYP450 (MICHAUD et al., 2005; PARKER et al., 2017). Em concordância, está o resultado do delta das mensurações de PTH sérico, que também tendeu a ser menor nos cães doentes renais crônicos no estágio 2, tratados com células-tronco mesenquimais, em comparação ao placebo.

A redução da razão $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3 : 25(\text{OH})\text{D}_3$ nos cães do subgrupo A – CTM corrobora com a hipótese de que haja menor degradação do calcidiol neste caso. A concentração sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ abaixo da normalidade estimula a conversão de calcidiol em calcitriol, de modo a deslocar o eixo metabólico no sentido de aumentar a síntese da forma ativa da vitamina D_3 , inibindo assim, a sua degradação (HAZEWINKEL; TRYFONIDOU, 2002; PARKER et al., 2017).

Resultados semelhantes para a variável $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ foram obtidos por Parker e colaboradores em um estudo clínico observacional, que avaliou o metabolismo mineral em cães doentes renais crônicos. Os autores relataram baixas mensurações de $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, mesmo diante de altos valores de FGF-23 (PARKER

et al., 2017). Um estudo prospectivo em humanos também observou o mesmo, e concluiu que o FGF-23 não contribui diretamente para a degradação da 25(OH)D₃ por estímulo a 24-hidroxilase, e que há alteração na atividade desta enzima em indivíduos doentes renais crônicos (STUBBS et al., 2014).

Quanto ao PTH, conforme mencionado anteriormente, os cães do subgrupo A – CTM apresentaram menores valores de delta para esta variável, em comparação ao subgrupo tratado com placebo (A – SF). Esta tendência pode estar associada ao incremento nas concentrações séricas dos metabólitos da vitamina D₃ após a terapia celular, nos cães doentes renais crônicos no estágio 2. Estudos evidenciam o papel central do calcitriol, bem como o de análogos capazes de ativar os VDRs, na prevenção do desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal nos estágios iniciais da DRC (DRUEKE, 2002; BROWN; SLATOPOLSKY, 2007; FRASER, 2009; DUSSO, 2011; ALVAREZ et al., 2012; COYNE et al., 2014).

Já no subgrupo B – CTM, as mensurações de PTH foram significativamente maiores no período pós-tratamento em comparação ao baseline, mas não ao placebo. Este resultado sugere que o aumento do PTH ocorreu devido ao efeito “tempo”, e não ao efeito “tratamento”; ou seja, a maior concentração de PTH observada neste subgrupo esteve possivelmente associada à progressão da DRC. Em concordância, estão os resultados obtidos para a creatinina sérica, cujas mensurações também foram significativamente maiores após a terapia celular, nos cães doentes renais crônicos no estágio 3, em comparação ao baseline, mas não ao placebo.

Observou-se ainda, a tendência de os valores do delta de PTH serem mais altos no subgrupo B – CTM em comparação ao subgrupo B – SF. Também houve a tendência das médias das determinações de uréia e creatinina séricas serem maiores desde o baseline, no subgrupo que recebeu terapia celular, do que naquele tratado com solução fisiológica. Desta forma, a julgar pelos marcadores indiretos de função renal, é provável que o subgrupo B – CTM já apresentasse doença renal crônica de caráter mais avançado do que o subgrupo B – SF, e por conseguinte, maiores concentrações de PTH; sob essa perspectiva, o tratamento com células-tronco mesenquimais não aparentou benefício para a atenuação do desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal nos cães doentes renais crônicos no estágio 3, o que pode ter ocorrido em virtude da grave uremia observada

neste subgrupo. Entretanto, futuras investigações com maior número de animais são necessárias para a confirmação desta hipótese.

A tendência de menor concentração de cálcio iônico, observada no subgrupo B – CTM após a terapia celular (em comparação ao baseline), associada aos valores insuficientes de calcitriol, também podem ter levado ao aumento das mensurações de PTH, no período pós-tratamento. Hipocalcemia e hipovitaminose D são gatilhos para a síntese e secreção de PTH (GALVAO et al., 2013).

Quanto à FEuCa, não houve diferença entre os tratamentos, em nenhum dos subgrupos avaliados. O valor da FEuCa no subgrupo A – CTM, entretanto, tendeu a diminuir após a terapia celular, em relação ao baseline. A redução no delta dos valores de uréia sérica em comparação ao placebo, o aumento na média da concentração sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e o discreto aumento na média de PTH após a terapia celular, são tendências observadas que podem auxiliar na elucidação do resultado encontrado para a FEuCa.

Sabe-se que a fração de excreção urinária de eletrólitos é inversamente correlacionada à taxa de filtração glomerular, e assim, o menor valor de delta obtido para a variável uréia sérica, um marcador indireto de filtração, poderia justificar a redução nas porcentagens da FEuCa observadas no subgrupo A – CTM. Os hormônios calciotróficos, por sua vez, também exercem importante efeito sobre a regulação do transporte ativo de cálcio no néfron distal. O aumento da expressão de TRPV5 no túbulo contornado distal e de conexão, é um mecanismo comum ao calcitriol e ao PTH, pelo qual ocorre a reabsorção de cálcio, e assim, a menor fração de excreção urinária deste eletrólito (MOOR; BONNY, 2016; RAMALHO et al., 2019).

No atinente ao fósforo sérico, não houve diferença entre os subgrupos tratados com placebo ou células-tronco mesenquimais. Entretanto, foi observada a tendência de redução nas médias das mensurações de fósforo, nos momentos finais de acompanhamento, no subgrupo A – CTM, em comparação ao A – SF; os valores do delta para o fósforo sérico também tenderam a ser menores no subgrupo A – CTM, em comparação ao placebo, o que pode indicar o melhor controle fosfórico naqueles cães no estágio 2 da DRC, que receberam terapia celular; em paralelo, a FEuP tendeu a ser maior nestes animais no período pós-tratamento, possivelmente pelo efeito fosfatúrico do PTH e do FGF-23.

Em humanos com DRC moderada, altas mensurações de FGF-23 e de FEuP, foram associadas ao menor risco de mortalidade (DOMINGUEZ et al., 2013).

O nosso grupo obteve resultados similares em estudos prévios, com cães doentes renais crônicos em diferentes estágios. Nesta espécie, o aumento da FEuP, mediante normofosfatemia, foi indicativo de prognóstico favorável; por outro lado, a redução da FEuP em cães hiperfosfatêmicos, acompanhada de altas concentrações de FGF-23, foi indicativo de mau prognóstico (MARTORELLI, 2016; MARTORELLI et al., 2017).

O FGF-23 atua com o seu cofator, a proteína transmembrana denominada Klotho. O complexo FGF-23 receptor – Klotho inibe a expressão do NaPi2a e NaPi2c, por meio dos quais se dá a reabsorção de fósforo no túbulo proximal; uma vez que estes cotransportadores estejam suprimidos, ocorre fosfatúria. Pacientes com DRC apresentam deficiência de Klotho associada à resistência à ação do FGF-23, o que induz ao aumento permanente desta fosfatonina; o FGF-23, por sua vez, promove a excreção urinária de fósforo. Entretanto, a perda de massa renal funcionante devido à progressão da DRC, resulta em redução da FEuP e retenção fosfórica, mesmo diante de altos valores de FGF-23 (BLOCK et al., 2013; KURO-O, 2019).

Dominguez e colaboradores sugerem, então, a partir dos resultados de seu estudo coort, realizado em pacientes humanos doentes renais crônicos, que o aumento de FGF-23, acompanhado de reduzidas mensurações de FEuP, poderiam funcionar como marcadores não-invasivos para a baixa expressão ou atividade de Klotho nos rins (DOMINGUEZ et al., 2013).

Em consonância com os achados dos autores já referenciados, estão os resultados do presente estudo, observados no subgrupo B – CTM, no qual obteve-se altas concentrações séricas de FGF-23, acompanhado de FEuP insuficiente e hiperfosfatemia. Nota-se, ainda, que a tendência de agravamento da hiperfosfatemia no período pós-tratamento, ocorreu de forma concomitante à piora da função renal, sinalizada pelo aumento significativo da creatinina.

Não é possível afirmar, entretanto, que os animais deste subgrupo tinham, de fato, menor expressão de Klotho, conforme sugerido por Dominguez e colaboradores. Este importante componente do metabolismo mineral não foi diretamente avaliado no presente estudo, sendo necessárias investigações futuras para elucidar o comportamento do Klotho em cães doentes renais crônicos.

À análise da curva de Kaplan-Meier, não foi verificada diferença na proporção de sobrevida entre os subgrupos tratados com placebo ou células-tronco

mesenquimais. O número reduzido de cães selecionados neste estudo e o curto tempo de acompanhamento, podem ter contribuído para o resultado observado.

Conforme esperado, os cães que apresentaram altas mensurações de PTH (PTH > 8,0 pmol/L), apresentaram a proporção de sobrevida significativamente menor em comparação aos demais. Resultados semelhantes quanto à sobrevida foram observados em estudos clínicos, com gatos doentes renais crônicos, que avaliaram o efeito da dieta com baixos teores de fósforo, sobre as variáveis do metabolismo mineral; em cães, estudos com o mesmo design mostraram-se controversos, o que os autores atribuíram à curta duração da intervenção ou do período de acompanhamento, ou ainda, ao número limitado de animais utilizados (BARBER et al., 1999; ELLIOT et al., 2000; JACOB et al., 2002; ROSS et al. 2006).

O desenvolvimento do hiperparatireoidismo é um importante distúrbio do metabolismo ósseo-mineral, e é sabidamente um fator de morbimortalidade em doentes renais crônicos (SPRAGUE; COYNE, 2010; SHALHOUB et al., 2012; KOVESDY et al., 2015).

Quanto aos resultados de sobrevida, considerando-se a variável calcitriol, os cães que tiveram as menores concentrações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (< 35 pg/mL) tenderam a apresentar a menor proporção de sobrevida. A deficiência de vitamina D3 desempenha papel central no desenvolvimento dos distúrbios do metabolismo ósseo-mineral, o que, por sua vez, está associado às altas taxas de mortalidade; em face disto, em humanos doentes renais crônicos, a recomendação para a suplementação de vitamina D e/ou de análogos que ativem os VDRs, é bem estabelecida (TENG et al., 2005; COYNE et al., 2014; KOVESDY et al., 2015; KDIGO, 2017).

Em medicina veterinária, há poucos estudos que se dedicaram a avaliar o efeito dos metabólitos da vitamina D₃ na sobrevida, ou a participação destes nos distúrbios do metabolismo mineral, em animais doentes renais crônicos. Em cães, um ensaio clínico realizado em 37 doentes renais crônicos nos estágios 3 e 4, demonstrou que o grupo tratado com calcitriol teve redução significativa da mortalidade, ao final de 1 ano de acompanhamento (ROSS et al, 2005). Em outro estudo, que utilizou gatos saudáveis (n= 10) e com doença renal crônica (n= 10), o uso do calcitriol não afetou as concentrações séricas de PTH de modo significativo, comparando-se os períodos pré e pós-tratamento (HOSTUTLER et al., 2006). Futuras investigações, com maior tempo de acompanhamento e maior tamanho

amostral, são necessárias para elucidar os efeitos dos metabólitos da vitamina D sobre os mais diversos desfechos, em cães e gatos doentes renais crônicos.

Há algumas limitações em nosso estudo, a começar pelo número reduzido de cães selecionados, e o tempo relativamente curto de acompanhamento. O ponto crítico é, sem dúvida, a ausência de padronização dietética entre os grupos, o que pode influenciar a análise dos metabólitos da vitamina D₃, especialmente, as concentrações séricas de 25(OH)D₃. É importante ressaltar que os cães dependem exclusivamente da dieta para atender as suas necessidades nutricionais de vitamina D, diferentemente dos humanos e de outras espécies de mamíferos, os quais também dependem da radiação ultravioleta solar, para a ativação do precursor desta vitamina, 7-DHC, na pele (HOW et al., 1994).

Apesar de termos identificado quais eram as dietas em uso por todos os cães ao longo do acompanhamento, o que facilita o acesso às informações descritas no rótulo sobre o teor de vitamina D, as dietas não foram submetidas à análise quantitativa. Desta forma, não é possível estabelecer, de modo preciso, qual era o conteúdo de vitamina D das dietas dos cães, no presente estudo.

Diversos estudos já demonstraram o papel das dietas com baixos teores de fósforo, na prevenção do desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal, e na atenuação dos valores de FGF-23, em cães e gatos doentes renais crônicos (FINCH et al., 2013; GEDDES et al., 2016). É provável que a dieta tenha influenciado os resultados obtidos para as concentrações séricas de fósforo, PTH e FGF-23; entretanto, não é possível afirmar, pois o nosso estudo não foi desenhado para atender este objetivo, e ainda, não houve padronização das dietas nos grupos tratados com células-tronco mesenquimais ou placebo.

Quanto a análise de Kaplan-Meier, é importante notar que os dados não foram ajustados quanto à idade ou ao estadiamento da doença renal crônica, fatores estes que podem influenciar as curvas de sobrevida. O reduzido número de animais utilizados na análise também pode ter contribuído de modo crítico para os resultados obtidos.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo quasi-experimental a avaliar os efeitos da terapia celular sobre o metabolismo mineral, em cães com doença renal crônica de ocorrência natural. Futuras investigações a serem realizadas com o tamanho amostral maior e o tempo de acompanhamento mais longo, com padronização dietética, são necessários para afirmar se o tratamento com células-tronco mesenquimais pode prevenir, ou atenuar, o desenvolvimento dos distúrbios do metabolismo mineral em cães doentes renais crônicos.

8 CONCLUSÃO

É possível que o uso da terapia celular, principalmente nos estágios iniciais da DRC, traga benefícios; por ora, não é possível afirmar que o tratamento com células-tronco mesenquimais atenua os distúrbios do metabolismo mineral, em cães doentes renais crônicos nos estágios 2 e 3.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, C. S.; VOLPINI, R. A.; SCHIMIZU, H.; SANCHES, T. R.; SEMEDO, P.; DI JURA, V. L.; CÂMARA, N. O.; SEGURO, A. C.; ANDRADE, L. C. Lineage-Negative Bone Marrow Cells Protect Against Chronic Renal Failure. **Stem Cells**, v. 27, p. 682–692, 2009.
- ALFARANO, C., C.; ROUBEIX, R. C.; CECCALDI, C.; CALISE, C.; MIAS, D.; CUSSAC, J. Intraparenchymal Injection of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Reduces Kidney Fibrosis After Ischemia-Reperfusion in Cyclosporine-Immunosuppressed Rats. **Cell Transplantation**, v. 21, p. 2009–2019, 2012.
- BARBER, P. J.; RAWLINGS, J. M.; MARKWELL, J.; ELLIOTT, J. Effect of Dietary Phosphate Restriction on Renal Secondary Hyperparathyroidism in the Cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 40, p.62–70, 1999.
- BI, B.; SCHMITT, R.; ISRAILOVA, M.; NISHIO, H.; CANTLEY, L. G. Stromal Cells Protect against Acute Tubular Injury via an Endocrine Effect. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 18, p. 2486–2496, 2007.
- BIAN, X.; ZHANG, B.; GUO, W.; LIU, N.; BAI, Y.; MIAO, J.; ZHAO, G.; LIU, B.; WANG, S.; ZHENG, L.; ZHAO, Y.; LI, D.; FENG, J. Nephrology Effects of Mesenchymal Stem Cells Transplanted at Different Time Points in a Rat Remnant Kidney Model. **American Journal of Nephrology**, v. 39, p.75–84, 2014.
- BLOCK, G. A.; IX, J. H.; KETTELER, M.; MARTIN, K. J.; THADHANI, R. I.; TONELLI, M.; WOLF, M.; JÜPPNER, H.; HRUSKA, K.; WHEELER, D. C. Phosphate Homeostasis in CKD: Report of a Scientific Symposium Sponsored by the National Kidney Foundation. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 62, n. 3, p. 457–473, 2013.
- BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, M. F.; JANZ, F. L. Características Biológicas das Células-Tronco Mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 3, p. 25–35, 2009.
- CANTALUPPI, V.; BIANCONE, L.; QUERCIA, A. Rationale of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Kidney Injury. **Kidney International**, v. 61, n. 2, p.300–309, 2013.
- CAVAGLIERI, R. C.; MARTINI, D.; SOGAYAR, M.C. Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model. **Transplantation Proceedings**, v. 41, p. 947–951, 2009.
- CHACAR, F. C.; KOGIKA, M. M.; SANCHES, T. R.; CARAGELASCO, D. S.; RODRIGUES, C. E.; CAPCHA, J. M. C.; CHEW, D. J. Urinary Tamm-Horsfall Protein, Albumin, Vitamin D-Binding Protein, and Retinol-Binding Protein as Early Biomarkers of Chronic Kidney Disease in Dogs. **Physiological Reports**, v. 5, n. 11, p. 1–9, 2017.

CHRISTAKOS, S.; AJUBADE, D. V.; DHAWAN, P.; FECHNER, A. J.; MADY, L. J. Vitamin D: metabolism. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 38, n. 2, p. 1–11, 2012a.

CHRISTAKOS, S.; DHAWAN, P.; PORTA, A.; MADY, L. J.; SETH, T. Vitamin D and Intestinal Calcium Absorption. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 347, n. 1, p. 25–29, 2012b.

CHOI, S.; PARK, M.; KIM, J. The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of chronic renal failure. **Stem Cells and Development**, v. 18, p. 521–529, 2009.

CORBEE, R. J.; VAANDRAGER, A. B.; MARJA, J. L.; MARTIJN, K. R.; HAZEWINKEL, A. W. Cutaneous Vitamin D Synthesis in Carnivorous Species. **Journal of Veterinary Medicine and Research**, v. 2, p. 4–7, 2015.

COYNE, D. W.; GOLDBERG, S.; FABER, M.; GHOSSEIN, C.; SPRAGUE, S. M. A Randomized Multicenter Trial of Paricalcitol versus Calcitriol for Secondary Hyperparathyroidism in Stages 3 – 4 CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, p. 1620–1626, 2014.

DOMINGUEZ, J. R.; SHLIPAK, M. G.; WHOOLEY, M. A.; IX, J. H. Fractional Excretion of Phosphorus Modifies the Association between Fibroblast Growth Factor-23 and Outcomes. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 24, p. 647–654, 2013.

DOMINICI, M.; BLANC, K. L.; MUELLER, F. C.; MARINI, D. S.; KRAUSE, R. J.; DEANS, A.; KEATING, D. J.; HORWITZ, P. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: The International Society for Cellular Therapy Position Statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–17, 2006.

DONATE-CORREA, J.; MUROS-DE-FUENTES, M.; MORA-FERNA, C.; NAVARRO-GONZA, J. F.; FGF23 / Klotho Axis: Phosphorus, Mineral Metabolism and Beyond. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 23, p. 37–46, 2012.

DUSSO, A. S.; BROWN, A. J.; SLATOPOLSKY, E. Vitamin D. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 289, p. F8–F28, 2005.

ELLIOT, J.; RAWLINGS, J. M.; MARKWELL, P. J.; BARBER, P. J. Survival of Cats with Naturally Occurring Chronic Renal Failure: Effect of Dietary Management. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, p. 235–42, 2000.

FANG, Y. A. N.; TIAN, X.; BAI, S.; FAN, J. U. N.; HOU, W. Autologous Transplantation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy in Rats by Inhibiting Oxidative Stress, pro-Inflammatory Cytokines and the P38 MAPK Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, p. 85–92, 2012.

FINCH, N. C.; GEDDES, R. F.; SYME, H. M.; ELLIOTT, J. Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23) Concentrations in Cats with Early Nonazotemic Chronic Kidney Disease (CKD) and in Healthy Geriatric Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p. 227–233, 2013.

FOSTER, J. D. Update on Mineral and Bone Disorders in Chronic Kidney Disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 46, n. 6, p. 1131–49, 2016.

FRASER, W. D. Hyperparathyroidism. **The Lancet**, v. 374, p. 145–158, 2009.

GALVAO, J. F. B.; NAGODE, L. A.; SCHENCK, P. A.; CHEW, D. J. Calcitriol, Calcidiol, Parathyroid Hormone, and Fibroblast Growth Factor-23 Interactions in Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n. 2, p. 134–62, 2013.

GEDDES, R. F.; BIOURGE, V.; CHANG, Y.; SYME, H. M.; ELLIOTT, J. The Effect of Moderate Dietary Protein and Phosphate Restriction on Calcium-Phosphate Homeostasis in Healthy Older Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 1690–1702, 2016.

GOMES, S. A.; MACHADO, L. R.; NORONHA, I. L.; JORGETTI, V.; HEILBERG, I. P. RANKL is a Mediator of Bone Resorption in Idiopathic Hypercalciuria. **Clinical Journal of The American Society of Nephrology**, v. 3, n. 5, p. 1446–1452, 2008.

GUTIERREZ, O.; ISAKOVA, T.; RHEE, E.; SHAH, A.; HOLMES, J.; COLLERONE, G.; JU, H. WOLF, M. Fibroblast Growth Factor-23 Mitigates Hyperphosphatemia but Accentuates Calcitriol Deficiency in Chronic Kidney Disease. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 16, p. 2205–2215, 2005.

HARJES, L. M.; PARKER, V. J.; DEMBEK, K.; YOUNG, G. S.; GIOVANINNI, L. H.; KOGIKA, M. M.; CHEW, D. J.; TORIBIO, R. E. Fibroblast Growth Factor-23 Concentration in Dogs with Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, p. 784–790, 2017.

HAZEWINKEL, H. A. W.; TRYFONIDOU, M. A. Vitamin D₃ Metabolism in Dogs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, p. 23–33, 2002.

HOSTULER, R.A.; DIBARTOLA, S. P.; CHEW, D. J.; NAGODE, L. A.; SCHENCK, P. A.; SCHULTZ, J. R.; DROST, W. T. Comparison of the Effects of Daily and Intermittent-Dose Calcitriol on Serum Parathyroid Hormone and Ionized Calcium Concentrations in Normal Cats and Cats with Chronic Renal Failure. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 1307–13, 2006.

HOW K. L.; HAZEWINKEL, H. A.; MOL, J.A. Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D. **General and Comparative Endocrinology**, v. 96, p. 12–18, 1994.

HU, M. C.; SHI, M.; ZHANG, J.; QUIN, H.; KURO-O, M.; MOE, O. W. Klotho Deficiency Causes Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 22, p. 124–36, 2011.

JACOB, F.; POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; ALLEN, T. A.; KIRK, C. A.; NEATON, J. D.; LEKCHAROENSUK, C.; SWANSON, L. L. Clinical Evaluation of Dietary Modification for Treatment of Spontaneous Chronic Renal Failure in Dogs. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 220, n. 8, p. 1163–1670, 2002

KDIGO. Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). **Kidney International**, v. 7, n.1, p. 1–59, 2017.

KLINKHAMMER, B. M.; KRAMANN, R.; MALLAU, M.; MAKOWSKA, A.; VAN, C. R.; RONG, S.; BUECHER, E. B.; BOOR, P.; KOVACOVA, K.; ZOK, S.; DENECKE, B.; STUETTGEN, E.; OTTEN, S.; FLOEGE, J.; KUNTER, U. Mesenchymal Stem Cells from Rats with Chronic Kidney Disease Exhibit Premature Senescence and Loss of Regenerative Potential. **PLOS One**, v. 9, n. 3, p. 1–12, 2014.

KOVESDY, C.; AHMADZADEH, S.; ANDERSON, J.; KALANTAR-ZADEH, K. Association of Activated Vitamin D Treatment and Mortality in Chronic Kidney Disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 168, n. 4, p. 397–403, 2015.

KURO-O, M. Klotho, Phosphate and FGF-23 in Ageing and Disturbed Mineral Metabolism. **Nature Reviews in Nephrology**, v. 9, p. 650 - 660, 2013.

KURO-O, M. The Klotho Proteins in Health and Disease. **Nature Reviews in Nephrology**, v. 15, n. 1, p. 27–44, 2019.

KURO-O, M.; MATSUMURA, Y.; AIZAWA, H.; KAWAGUCHI, H.; SUGA, T.; UTSUGI, T. Mutation of the Mouse Klotho Gene Leads to a Syndrome Resembling Ageing. **Nature**, v. 390, n. 6, p.45–51, 1997.

LEE, S.; RYU, M.; SEO, M.; PARK, S.; AHN, J.; HAN, S.; KANG, K.; BHANG, D.; YOUN, H. Mesenchymal Stem Cells Contribute to Improvement of Renal Function in a Canine Kidney Injury Model. **In Vivo**, v. 31, p. 1115–1524, 2017.

MARTIN, K. J.; GONZA, E. A. Clinical Consequences and Management of Hypomagnesemia. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, p. 2291–2295, 2009.

MARTORELLI, C. R. **Avaliação sequencial do metabolismo do cálcio e do fósforo com ênfase na determinação do fator de crescimento de fibroblastos (FGF-23) e da fração de excreção urinária de fósforo (uFEP) de cães com doença renal crônica submetidos à terapia com células-tronco mesenquimais**. Tese de doutorado em Ciências. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

MARTORELLI, C. R.; KOGIKA, M. M.; CHACAR, F. C.; CARAGELASCO, D. S.; PINTO, A. C. B.; LORIGADOS, C.; ANDRADE, L. C. Urinary Fractional Excretion of Phosphorus in Dogs with Spontaneous Chronic Kidney Disease. **Veterinary Sciences**, v. 4, n. 67, p. 1–10, 2017.

MICHAUD, J.; DUBE, P.; NAUD, J.; LEBLOND, A. F.; DESBIENS, K.; BONNARDEAUX, A.; PICHETTE, V. Effects of Serum from Patients with Chronic Renal Failure on Rat Hepatic Cytochrome P450. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, p. 1067–1077, 2005.

MOOR, M. B.; BONNY, O. Ways of Calcium Reabsorption in the Kidney. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, v. 310, p. 1337–1350, 2016.

MORIGI, M.; ROTA, C.; REMUZZI, G. Mesenchymal Stem Cells in Kidney Repair. **Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1416, p. 89–107, 2016.

NAGODE, L. A.; CHEW, D. J.; PODELL, M. Benefits of Calcitriol Therapy and Serum Phosphorus Control in Dogs and Cats with Chronic Renal Failure: Both Are Essential to Prevent or Suppress Toxic Hyperparathyroidism. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n.6, p.1293–1330, 1996.

NOH, H.; YU, M. R.; KIM, H. J.; JEON, J. S.; KWON, S. H.; JIN, S. Y.; LEE, J.; JANG, JOON, J.; PARK, O.; ZIYADEH, F.; HAN, D. C.; LEE, B. H. Uremia Induces Functional Incompetence of Bone Marrow-Derived Stromal Cells. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, p. 218–225, 2012.

PAPAZOVA, D. A.; OOSTERHUIS, N. R.; GREMMELS, H.; KOPPEN, A. V.; JOLLES, J. A.; VERHAAR, V. C.; Cell-Based Therapies for Experimental Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Disease Models & Mechanisms**, v. 8, p. 281–293, 2015.

PARKER, V. J.; HARJES, L. M.; DEMBEK, K.; YOUNG, G. S.; CHEW, D. J.; TORIBIO, R. E. Association of Vitamin D Metabolites with Parathyroid Hormone, Fibroblast Growth Factor-23, Calcium, and Phosphorus in Dogs with Various Stages of Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 791–798, 2017.

PEACOCK, M. Calcium metabolism in health and disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 1, p. 23–30, 2010.

PENIDO, M. G.; ALON, U. S. Phosphate Homeostasis and Its Role in Bone Health. **Pediatric Nephrology**, v. 27, p. 2039–48, 2012.

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

PRESSLER, B. M. Clinical Approach to Advanced Renal Function Testing in Dogs and Cats. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 3, p. 487–502, 2015.

QUIMBY, J. M.; BORJESSON, D. L. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Cats Current Knowledge and Future Potential. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 20, n.3, p. 208–216, 2018.

QUIMBY, J. M.; WEBB, T. L.; RANDALL, E.; MAROLF, A.; VALDESMARTINEZ, A.; DOW, S. W. Assessment of Intravenous Adipose-Derived Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Feline Chronic Kidney Disease: A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial in Eight Cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 2, p. 165–271, 2016.

RAMALHO, J.; PETRILLO, E. M.; TAKEICHI, A. P. M.; MOYSES, R. M. A.; TITAN S. M. Calcitriol and FGF - 23, but Neither PTH nor Sclerostin, Are Associated with Calciuria in CKD. **International Urology and Nephrology**, v. 51, n. 10, p. 1823–1829, 2019.

RAZZAQUE, M. S. The FGF23–Klotho Axis: Endocrine Regulation of Phosphate Homeostasis. **Nature Reviews in Endocrinology**, v. 5, n. 11, p. 611–619, 2009.
ROSS, S. J.; OSBORNE, C. A.; KIRK, C. A.; LOWRY, S. R.; KOEHLER, L. A.; POLZIN, D. J. Clinical Evaluation of Dietary Modification for Treatment of Spontaneous Chronic Kidney Disease in Cats. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 229, n. 6, p. 949–957, 2006.

RUDINSKY, A. J.; HARJES, L. M.; BYRON, J.; CHEW, D. J.; TORIBIO, R. E.; LANGSTON, C.; PARKER, V. J. Factors Associated with Survival in Dogs with Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, p. 1977–1982, 2018.

SATO, T.; COURBEBAILLISSE, M.; IDE, N.; FAN, Y.; HANAI, J.; KALUDJEROVIC, J. Parathyroid Hormone Controls Paracellular Ca²⁺ Transport in the Thick Ascending Limb by Regulating the Tight-Junction Protein Claudin 14. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 16, p. E3344–E3353, 2017.

SEGEV, G.; SHIPOV, A. Does Secondary Renal Osteopathy Exist in Companion Animals? Dog Cat Mineral Density Quality Bone Hyperparathyroidism. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 46, n. 6, p. 1151–1162, 2016.

SHALHOUB, V. ; ESCHENBERG, M.; WILLIAM, G.; SHATZEN, E. M.; SABRINA, C.; WARD, J. D.; STEVENS, J.; BI, V.; RENSHAW, L.; HAWKINS, N.; WANG, W.; CHEN, C.; TSAI, M. CATTLEY, R. C. WRONSKI, T. J.; XIA, X.; LI, X. FGF23 Neutralization Improves Chronic Kidney Disease – Associated Hyperparathyroidism yet Increases Mortality Find the Latest Version: FGF23 Neutralization Improves Chronic Kidney Disease – Associated Hyperparathyroidism yet Increases Mortality. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 7, p. 2543–2553, 2012.

SHI, Y.; WANG, Y.; LI, Q.; LIU, K.; HOU, J.; SHAO, C.; WANG, Y. Immunoregulatory Mechanisms of Mesenchymal Stem and Stromal Cells in Inflammatory Diseases. **Nature Reviews in Nephrology**, v. 14, n. 8, p. 493–507, 2018.

SILVA, B. C.; BILEZIKIAN, J. P. Parathyroid hormone: Anabolic and catabolic actions on the skeleton. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 22, p. 41–50, 2015.

SPRAGUE, S. M.; COYNE, D. Control of Secondary Hyperparathyroidism by Vitamin D Receptor Agonists in Chronic Kidney Disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 14, p. 512–518, 2010.

STUBBS, J. R.; ZHANG, S.; FRIEDMAN, P. A.; NOLIN, T. D. Decreased Conversion of 25-Hydroxyvitamin D3 to 24,25-Dihydroxyvitamin D3 Following Cholecalciferol Therapy in Patients with CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, p. 1965–1973, 2014.

TENG, M.; WOLF, M.; OFSTHUN, M. N.; LAZARUS, J. M.; HERNA, M. A. Activated Injectable Vitamin D and Hemodialysis Survival: A Historical Cohort Study. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 16, p. 1115–1125, 2005.

THOMSON, A. L.; BERENT, A. C.; WEISSE, C.; LANGSTON, C. E. Intra-Arterial Renal Infusion of Autologous Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Chronic Kidney Disease in Cats: Phase I Clinical Trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, p. 1353–1361, 2019.

TÖGEL, F. E.; WESTENFELDER, C. Mesenchymal Stem Cells: A New Therapeutic Tool for AKI. **Nature Reviews in Nephrology**, v. 6, n. 3, p. 179–183, 2010.

TOKA, H. R.; POLLAK, M. R.; HOUILLIER, P. Calcium Sensing in the Renal Tubule. **Physiology**, v. 30, p. 317–326, 2015.

VILLANUEVA, S.; CARRENO, J.; SALAZAR, L.; VILLANUEVA, S.; CARRE, J. E.; IRARR, N. C.; BARTOLUCCI, J.; FIGUEROA, F.; CARLOS, P. Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue Reduce Functional and Tissue Damage in a Rat Model of Chronic Renal Failure. **Clinical Science**, v. 125, p. 199–210, 2013.

VILLANUEVA, S.; EWERTZ, E.; ON, F. C.; AEZ, P. J. S.; AZABAL, C. I.; CARRE, J. E.; FIGUEROA, F.; VIO, C. P. Mesenchymal Stem Cell Injection Ameliorates Chronic Renal Failure in a Rat Model. **Clinical Science**, v. 121, p.489–499, 2011.

ZOJA, C.; GARCIA, P.B.; ROTA, C. Mesenchymal stem cell therapy promotes renal repair by limiting glomerular podocyte and progenitor cell dysfunction in adriamycin-induced nephropathy. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 303, p. F1370–F1381, 2012.

APÊNDICE B – RESULTADOS PRÉ E PÓS-TRATAMENTO (GRUPOS A E B)

Comparação das médias das variáveis do metabolismo mineral, entre os grupos A e B, antes do tratamento com placebo (A – SF e B – SF) ou células-tronco mesenquimais (A – CTM ou B – CTM)

Comparação das médias das variáveis do metabolismo mineral, entre os grupos A e B, após o tratamento com placebo (A – SF e B – SF) ou células-tronco mesenquimais (A – CTM ou B – CTM)

ANEXO A – RESULTADOS COMPILADOS

Média $\pm$ desvio-padrão (mínimo – máximo) ou mediana (mínimo – máximo) das variáveis do metabolismo mineral, obtidas nos cães clinicamente normais (Grupo C), e doentes renais crônicos nos estágios 2 e 3 (grupos A e B), tratados com solução fisiológica (subgrupo SF) ou células-tronco mesenquimais (subgrupo CTM), no pré e pós-tratamento.

Variáveis	Grupo C	Grupo A		Grupo B	
		SF	CTM	SF	CTM
		Pré/Pós	Pré/Pós	Pré/Pós	Pré/Pós
1,25(OH) ₂ D ₃ (pg/mL)	57,14 $\pm$ 12 (35,10 – 76,70)	62,88 $\pm$ 27,95 (25,0 – 90,7)	39,22 $\pm$ 14,49 (16,1 – 58,10)	40,71 $\pm$ 14,37 (21,8 – 55,10)	30,94 $\pm$ 23,20 (7,2 – 73,60)
		62,78 $\pm$ 23 (35,62 – 88,17)	48,72 $\pm$ 14,60 (28,55 – 70,53)	34,30 $\pm$ 19,32 (14,60 – 70,80)	33,93 $\pm$ 22,43 (7,90 – 67,30)
25(OH)D ₃ (ng/mL)	41,12 $\pm$ 16,24 (14,10 – 74,50)	62,87 $\pm$ 37,0 (15,80 – 126,30)	33,20 $\pm$ 18,11 (8,7 – 49,20)	39,31 $\pm$ 20,80 (10,90 – 74,60)	27,70 $\pm$ 6,35 (19,90 – 38)
		55,13 $\pm$ 28,77 (10 – 97,80)	45,86 $\pm$ 29,89 (8,2 – 79,3)	30,66 $\pm$ 27,83 (2,5 – 71,90)	36,80 $\pm$ 11,77 (27,80 – 59,30)
24,25(OH) ₂ D ₃ (ng/mL)	28,82 $\pm$ 12,97 (6,2 – 49,50)	24,83 $\pm$ 13,36 (7,4 – 45,40)	15,13 $\pm$ 9,4 (5,4 – 28,70)	10,09 $\pm$ 6,87 (1,6 – 20,80)	6,70 $\pm$ 4,17 (4,10 – 14,10)
		21,45 $\pm$ 12,11 (4,2 – 38,7)	16,68 $\pm$ 10,72 (3,3 – 28,75)	7,0 $\pm$ 4,67 (1,80 – 11,60)	7,26 $\pm$ 4,52 (4,0 – 16,10)
PTH (pmol/L)	1,0 $\pm$ 0,5 (0,5 – 2,2)	2,36 $\pm$ 1,8 (0,8 – 5,6)	1,81 $\pm$ 1,0 (0,9 – 3,6)	6,4 (0,8 – 28,3)	5,28 $\pm$ 3,9 (1,1 – 11,5) ^a
		3,15 $\pm$ 2,20 (1,15 – 7,10)	2,30 $\pm$ 0,65 (1,6 – 3,45)	6,7 (0,55 – 153)	42,48 $\pm$ 39,32 (1,7 – 116,1) ^b
Cálcio total (mg/dL)	9,18 $\pm$ 0,79 (7,47 – 10,89)	10,55 $\pm$ 0,67 (9,80 – 11,70)	10,30 $\pm$ 1,18 (9,19 – 12,60)	10,32 $\pm$ 0,93 (9,2 – 12)	11,11 $\pm$ 1,54 (9,43 – 14)
		10,20 $\pm$ 0,51 (9,70 – 11,15)	10,15 $\pm$ 0,70 (8,47 – 12,60)	10,47 $\pm$ 1,27 (8,52 – 12,18)	10,86 $\pm$ 0,74 (9,92 – 12,03)
Cálcio iônico (mmol/L)	1,40 $\pm$ 0,04 (1,32 – 1,47)	1,42 $\pm$ 0,09 (1,28 – 1,55)	1,38 $\pm$ 0,07 (1,31 – 1,51)	1,41 $\pm$ 0,08 (1,28 – 1,53)	1,43 $\pm$ 0,06 (1,35 – 1,52)
		1,36 $\pm$ 0,05 (1,29 – 1,43)	1,35 $\pm$ 0,01 (1,33 – 1,36)	1,46 $\pm$ 0,05 (1,41 – 1,52)	1,22 $\pm$ 0,18 (0,97 – 1,45)
FEuCa (%)	0,35 $\pm$ 0,39 (0,06 – 1,37)	0,41 $\pm$ 0,33 (0,11 – 1,07)	1,05 $\pm$ 0,75 (0,19 - 2,02)	1,06 $\pm$ 0,96 (0,24 - 2,73)	0,71 $\pm$ 0,81 (0,07 – 2,55)
		0,36 $\pm$ 0,25 (0,08 - 0,78)	0,57 $\pm$ 0,30 (0,13 - 0,84)	0,91 $\pm$ 0,53 (0,28 – 1,88)	0,80 $\pm$ 0,63 (0,07 - 1,91)
FGF-23 (pg/mL)	263,4 $\pm$ 79,68 (144,6 – 422,7)	356 $\pm$ 223,8 (178,7 – 683)	1065,6 e 505,5 (n= 2)	1415 $\pm$ 453,8 (957,6 – 1866)	5091 $\pm$ 4657 (1046 – 14193)
		380 $\pm$ 327,5 (119,2 – 859,3)	718,25 e 508,10 (n= 2)	7160 $\pm$ 7700 (1022 – 17524)	20471 $\pm$ 35289 (1645 – 98866)

Fósforo sérico (mg/dL)	3,25 ± 1,30 (1,49 – 5,7)	3,46 ± 0,88 (1,90 – 4,2) 3,55 ± 0,71 (1,90 – 5,4)	3,52 ± 0,73 (2,48 – 4,41) 3,53 ± 0,68 (2,15 – 5,51)	4,4 (3,6 – 8,5) 4,8 (3,1 – 11,8)	5,0 (2,5 – 6,6) 5,12 (3,0 – 16,0)
FEuP (%)	10,15 (0,9 - 67)	10,91 ± 7,68 (4,6 - 25,90) 14,52 ± 9,97 (1,38 – 45,18)	27,59 ± 19,39 (4,65 – 47,69) 41,82 ± 25,21 (5,7 – 100,8)	18,03 ± 9,21 (7,42 – 34,94) 26,53 ± 17,46 (2,27 – 92,80)	31,45 ± 15,04 (15,64 – 63,89) 31,68 ± 18,51 (4,07 – 79,47)
Creatinina sérica (mg/dL)	0,87 ± 0,16 (0,61 – 1,14)	1,65 ± 0,18 (1,5 – 2,0) 1,73 ± 0,32 (1,1 – 2,8)	1,55 ± 0,15 (1,30 – 1,73) 1,64 ± 0,31 (0,90 – 2,30)	2,53 ± 0,17 (2,4 – 2,8) 2,84 ± 0,51 (1,80 – 4,10)	3,17 ± 1,0 (2,10 – 4,7) ^a 3,67 ± 1,70 (1,80 – 12,90) ^b
Uréia sérica (mg/dL)	39,36 ± 8,4 (25,20 – 53,40)	58,60 ± 10,78 (39,80 – 68,50) 70,0 ± 26,76 (32,70 – 194,0)	74,30 ± 39,80 (28,10 – 134,6) 71,0 ± 35,52 (17,40 – 160,5)	144,4 ± 78,04 (63 – 271,1) 164,4 ± 85,81 (64,50 – 338,1)	193 ± 88,20 (45,8 – 318,8) 214,7 ± 91,56 (45,0 – 456)

Legenda: PTH (Paratormônio); FGF-23 (Fator de crescimento fibroblástico – 23); FEuCa (Fração de excreção urinária de cálcio); FEuP (Fração de excreção urinária de Fósforo); a, b (p< 0,05)